



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA.

Trabajo de Tesis Doctoral:

**"COMPUESTOS CON POTENCIALES APLICACIONES EN TERAPIAS
ANTIDEPRESIVAS Y ANTITIROIDEAS. ELABORACIÓN,
CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS
"IN VITRO" E "IN VIVO".**

Tesista: Lic. Nancy Martini

**Director/a: Dra. Evelina G. Ferrer,
Dra. P.A.M Williams**

Codirector/a: Dr. Carlos Laino

Año: 2020

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de las Profesoras Dra. Evelina G. Ferrer y Dra. Patricia A.M. Williams y bajo la codirección del Profesor Dr. Carlos Laino

Año 2020

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a las instituciones y personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral:

Al Director del CEQUINOR, Prof. Dr. Dr. Carlos O. Della Védova por permitirme desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral en el CEQUINOR.

Al CONICET por otorgarme la beca para el desarrollo de este trabajo de Tesis doctoral.

A la ANPCyT, CONICET y UNLP por el otorgamiento de fondos y subsidios necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.

A mis directoras, la Dra. Evelina G. Ferrer y Dra. Patricia A.M. Williams, y a mi co-director, el Dr. Carlos Laino *por estar disponibles siempre*, por sus importantes aportes a mi formación con toda su experiencia y por acompañarme siempre y por el cariño demostrado.

Al Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT) - UNLAR en el cual pude desarrollar parte del trabajo experimental.

Al personal técnico del CEQUINOR por todo su apoyo y colaboración incondicional.

A todos mis compañeros de CEQUINOR: Ruth, Diana, Valeria, Luciana, Juliana, Vicky, Gonzalo, Soledad, Helen, María Rosa, Yacelis, Cristian, Yanina y a todas aquellas personas en la que hemos compartidos y vividos momentos, por las charlas, anécdotas, dentro y fuera del laboratorio.

A Manuel, Benicio, Tomás y Pía, que con su amor y dulzura, por la infinita paciencia, me dieron fuerzas en muchos momentos difíciles en esta etapa de mi vida.

Índice

Capítulo 1 .OBJETIVOS.	1
Capítulo 2. INTRODUCCIÓN.	2
2.1. Complejos de coordinación.	2
2.1.2. Aplicaciones biomédicas de los compuestos de coordinación.	3
2.2. Los Metales: El rol en la medicina.	6
2.2.1. Aspectos de la química del Cu(II).	7
2.2.1.2. Estados de oxidación y geometría.	7
2.2.1.3. Espectros electrónicos característicos para cobre(II).	9
2.2.1.4. Espectro Infrarrojo (FTIR).	10
2.3. Aspectos biológicos del cobre.	11
2.3.1. Importancia biológica del cobre.	11
2.3.2. Cobre como pro-oxidante.	11
2.3.3. Enzimas dependientes de cobre.	12
2.3.4. Cobre y enfermedades asociadas.	13
2.3.4.1. Enfermedades genéticas.	13
2.3.5. Rol del cobre(II) en la depresión.	15
2.3.6. Rol del cobre en el estrés oxidativo.	16
2.4. Magnesio.	18
2.4.1. Aspectos biológicos del Magnesio.	18
2.4.2. Absorción y transporte de magnesio.	19
2.4.3. Química del magnesio.	19
2.4.4 Importancia de generar nuevos compuestos a partir de magnesio.	20
2.4.5. Rol del Magnesio en la depresión.	21
2.4.5.1. Magnesio y el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato).	22
2.5. Relevancia biológica de los ligandos seleccionados.	25
Metimidazol.	26
Clorhidrato de sertralono (sertralina).	27
Ácido piroglutámico.	29
N,N Dimetilacetamida (DMA).	30
2.6. Razones para formar complejos de coordinación de Cu(II) y Mg(II) con ligandos de interés.	31
Capítulo 3. Preparación y caracterización fisicoquímica de los compuestos estudiados.	34
3.1. Síntesis de los compuestos, análisis elementales y estudios termogravimétricos.	34
3.1.1. Síntesis de los compuestos derivados de cobre y clorhidrato de sertralono (SerH ₂ Cl, sertralina): (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].1/2H ₂ O y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	34

3.1.1.1. Análisis elementales.	34
3.1.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).	34
3.1.2. Síntesis de los compuestos derivados de cobre y metimidazol.	36
3.1.2.1. Análisis elementales.	38
3.1.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).	38
3.1.3. Síntesis del compuesto derivado de Mg(II) y ácido piroglutámico.	39
3.1.3.1. Análisis elementales.	40
3.1.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA).	40
3.1.4. Síntesis de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (MgDMA).	41
3.1.4.1. Análisis elementales.	41
3.2. Caracterización de las estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X.	41
3.2.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	41
3.2.2. Derivado del ácido DL-pGlu y Mg(II): $[\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2]$.	49
3.2.2.1. Resultados y discusión del patrón de difracción de rayos X en polvo (PXR).	52
3.2.3. Cristalografía por rayos X del complejo $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	53
3.2.3.1. Estudio de las interacciones intermoleculares por análisis de Hirshfeld (HSS).	57
3.3. Espectroscopía Vibracional (Espectroscopía Infrarrojo (FTIR) y Raman).	59
3.3.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	59
3.3.2. Derivados de metimidazol y Cu(II) $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$, $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4](3)$.	61
3.3.3. Derivado del ácido DL-pGlu y Mg(II): $[\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2]$.	65
3.3.4. Derivado de la N,N-dimetilacetamida y Mg(II).	68
3.4. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR).	72
3.4.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	72
3.4.2. Derivados de metimidazol y Cu(II): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.	75
3.5. Reflectancia difusa.	76
3.5.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	76
3.5.2. Derivados de metimidazol y Cu(II): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.	77
3.5.3. Derivado del ácido DL-pGlu y Mg(II): $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	78
3.5.4. Complejo de Mg(II) y N,N dimetilacetamida.	79
3.6. Estudios de Estabilidad en solución.	79
3.6.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	80
3.6.2. Derivados de metimidazol y Cu(II): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y $\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}(2)$.	82

3.6.3. Mg(DL-pGlu) ₂ . Estudios en solución: Estabilidad y titulación espectrofotométrica.	85
3.6.3.1. Detección de la especie en solución: titulación espectrofotométrica.	87
3.6.4. Estabilidad de solución del complejo de MgDMA.	89
3.6.4.1. Simulación computacional espectro UV-vis de MgDMA.	90
3.7. Conclusiones.	92
3.7.1. Derivados de Cobre(II) y Clorhidrato de sertralono.	92
3.7.2. Derivados de Cobre(II) y Metimidazol.	92
3.7.3. Compuestos derivados de Magnesio on DL-piroglutámico y N,N Dimetilacetamida.	93
Capítulo 4. Actividades Biológicas <i>in vitro</i>.	94
4.1. Hipertiroidismo y enfermedad de Grave's Basedow.	94
4.1.1. Tratamiento farmacológico del hipertiroidismo.	95
4.1.2. Actividad antitiroidea de fármacos antidepresivos.	98
4.1.3. Actividad antitiroidea para el complejo (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	99
4.1.4. Actividad antitiroidea para el complejo Mg(DL-pGlu) ₂ .	102
4.1.5. Actividad antitiroidea del DMA y MgDMA.	104
4.2. Actividad antioxidante.	111
4.2.1. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.	111
4.2.2. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo.	113
4.2.2.1. Enzima superóxido dismutasa (SOD).	113
4.2.3. Estrés oxidativo y depresión.	115
4.2.4. Actividad antioxidante y enfermedad de Grave's.	116
4.2.5. Simulación de actividad de superóxido dismutasa (SOD).	118
4.2.5.1. Simulación de actividad superóxido dismutasa de (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	119
4.2.5.2. Actividad Superóxido dismutasa SOD-símil de los complejos [Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S)Cl ₂ ·2H ₂ O](1) y [Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ ·H ₂ O](2).	120
4.2.6. Actividad antioxidante DPPH•.	123
4.2.6.1. Actividad antioxidante DPPH• para (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	123
4.2.6.2. Actividad antioxidante DPPH• para los complejos: [Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂]·2H ₂ O(1) y Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ ·H ₂ O(2).	123
4.3. Fosfatasas.	126
4.3.1. Introducción.	126
4.3.1.1. Aspectos generales.	126
4.3.1.2. Estructura general de la fosfatasa.	127
4.3.1.3. Mecanismo de acción de la enzima.	130
4.3.2. Efectos de los complejos sobre la actividad de la Fosfatasa ácida (FAC).	132
4.3.3. Estimulación de la Fosfatasa alcalina por MgDMA.	136
4.4. Simulación de actividad de las peroxidasas.	139
4.4.1. Modelos in vitro seleccionados: fundamento.	142
4.4.1.1. Rojo fenol.	142
4.4.1.2. Oxidación del pirogalol.	142
4.4.2. Simulación de la actividad peroxidasa por parte del complejo	143

(SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	
4.4.3. Simulación de la actividad Peroxidasa por parte de complejos derivados de Cu(II) y metimidazol.	145
4.4.3.1. Rojo fenol (Bromoperoxidasa).	145
4.4.3.2. Oxidación del pirogalol.	150
4.5. Actividad Antimicrobiana.	152
4.5.1. Actividad antimicrobiana de drogas ISRS.	153
4.5.1.1. Actividad antimicrobiana del Cu(II).	154
4.5.2. Actividad antimicrobiana de (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	154
4.6. Conclusiones.	156
Capítulo 5. Biodisponibilidad: interacción de ligandos y compuestos de coordinación con albúmina sérica bovina.	160
5.1. Experimentos de fluorescencia intrínseca de la albúmina sérica bovina (ASB), espectroscopía UV-Vis y resonancia paramagnética electrónica (EPR).	162
5.1.1. Interacción de derivado de sertralina, (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄] con ASB.	162
5.1.2. Biodisponibilidad: Interacción de complejos derivados de cobre y metimidazol con ASB.	168
5.1.3. Fluorescencia 3D. Bispiroglutamato de Mg.	172
5. 1.4. Biodisponibilidad de [Mg(DMA) ₂ (H ₂ O) ₄]Cl ₂ .2H ₂ O con la ASB.	173
5.2. Conclusiones.	179
Capítulo 6. Actividades Biológicas <i>in vivo</i>.	180
6.1. La depresión.	180
6.1.1. Síntomas.	180
6.1.2. Epidemiología de la depresión.	181
6.1.3. Evolución y pronóstico.	183
6.2. Hipótesis biológicas actuales de la depresión.-	184
6.2.1. Serotonina.	185
6.2.2. Hipótesis monoaminérgica.	187
6.2.3. Hipotésis glutamatérgica.	188
6.3. TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS.	190
6.3.1 Los antidepresivos (ADs).	190
6.4. Relación entre tiroides y depresión.	193
6.5. Actividad Antidepresiva.	194
6.5.1. Actividad antidepresiva de (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	194
6.5.2. Actividad antidepresiva Mg(DL-pGlu) ₂ .	197
6.6. Actividad Analgésica.	200
6.6.1. Relación entre el dolor y la depression.	200
6.6.1.1. Relación neurobiológica entre el dolor y la depresión.	202
6.6.1.2. Efecto analgésico de los fármacos antidepresivos.	202
6.6.2. (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	203

6.6.3. Actividad analgésica. Derivados de Mg(II) y ácido DL-pGlu. Prueba de la platina caliente.	206
6.7. Conclusiones.	208
Capítulo 7. Materiales y métodos.	210
7.1. Caracterización fisicoquímica.	210
7.1.1. Análisis elemental.	210
7.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA).	210
7.1.3. Determinación de estructuras cristalinas.	210
7.1.3.1. Análisis de superficie Hirshfeld (HSs).	211
7.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR).	211
7.1.4.1. Simulación de espectros infrarrojos mediante métodos computacionales para $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MgDMA).	211
7.1.5. Espectros Raman.	212
7.1.6. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR).	212
7.1.7. Espectros de Reflectancia Difusa.	213
7.1.8. Espectros electrónicos (UV-vis).	213
7.2. Estudios en solución.	213
7.2.1. Estudios de estabilidad en solución.	213
7.2.2. Titulación espectrofotométrica.	213
7.3. Medidas de actividades Biológicas <i>in vitro</i>.	214
7.3.1. Actividad antitiroidea.	214
7.3.1.1. Determinación de la formación de complejo de transferencia de carga con iodo para relaciones molares 1:1.	214
7.3.1.2. Determinación de la Kc para relaciones estequiométricas superiores a 1:1.	215
7.3.2. Capacidad de inhibición de la enzima lactoperoxidasa (LPO).	216
7.4. Determinación de actividades antioxidantes.	216
7.4.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil.	216
7.4.2. Actividad antioxidante DPPH [•] .	217
7.5. Inhibición y activación de la actividad fosfatasa.	218
7.5.1. Determinación <i>in vitro</i> de la inhibición de la fosfatasa alcalina (FAL).	218
7.5.2. Determinación <i>in vitro</i> de la inhibición de la fosfatasa ácida (FAC).	218
7.5.3. Determinación <i>in vitro</i> de la activación de la fosfatasa alcalina.	219
7.6. Actividad peroxidasa símil.	220
7.6.1. Bromación del rojo fenol.	220
7.6.1.1. Oxidación catalítica de pirogalol.	220
7.6.1.2. Análisis de datos.	220
7.7. Actividad antimicrobiana.	221
7.8. Medidas de actividades Biológicas <i>in vivo</i>.	222
7.8.1. Actividad Antidepresiva. Animales: Tratamiento de los animales.	222

7.8.2 Tratamiento farmacológico con antidepresivos.	222
7.8.3. Prueba de natación forzada (PNF ó Forced swim test (FST)).	222
7.8.4. Prueba de campo abierto (PCA) (Open Field Test).	224
7.8.5. Diseño experimental y tratamiento farmacológico.	224
7.8.5.1. Complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	225
7.8.5.2. Complejo de magnesio.	226
7.9. Actividad analgésica.	227
7.9.1. Test de la Placa caliente.	227
7.9.2. Complejo de magnesio.	228
7.10. Medidas de interacción con albúmina sérica bovina (ABS).	228
Conclusiones generales.	231
Publicaciones.	235

Índice de figuras

Capítulo 2.

Figura 1. Representación de un complejo de coordinación.	3
Figura 2. Cisplatino.	4
Figura 3. Mecanismo de acción del cis-platino.	5
Figura 4. Desdoblamiento de orbitales d para (a) entorno octaédrico y (b) distorsión tetragonal.	9
Figura 5. Vías del cobre en el cuerpo y enfermedades de Wilson y Menkes.	14
Figura 6. Cobre, inhibidor del receptor NMDAR y AMPA.	16
Figura 7. Modelo teórico del cobre como nutriente antioxidante.	17
Figura 8. Receptor NMDA. Permeabilidad y bloqueo del canal de Ca(II) por Mg(II).	23
Figura 9. Muerte celular excitotóxica.	24
Figura 10. Estructura general de una tioamida.	25
Figura 11. Metimidazol: Formas tautoméricas.	26
Figura 12. Sertralina (Clorhidrato de sertralonio).	28
Figura 13. Estructuras del Ácido piroglutámico (pGlu).	29
Figura 14. N,N-Dimetilacetamida.	30
Figura 15. Resumen esquematizado.	33

Capítulo 3.

Figura 1. (A) Curva termogravimétrica $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$. (B) Curvas termogravimétricas para $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	35
Figura 2. Esquema de la síntesis de los complejos $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.	37
Figura 3. Curva termogravimétrica de $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$.	39
Figura 4. Análisis termogravimétrico (TGA) para $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	40
Figura 5. Estructuras cristalinas de (A) $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y (B) $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	42
Figura 6. Estructura cristalina de $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	49
Figura 7. Patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) del $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$, experimental y teórico.	53
Figura 8. (A) Estructura cristalina de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (B) empaquetamiento del cristal.	54
Figura 9. Mapas de superficies de Hirshfeld con d_{norm} .	58
Figura 10. Espectros de infrarrojo (SerH_2Cl) , $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$.	60
Figura 11. Espectros Raman de (SerH_2Cl) y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$.	61
Figura 12. Espectros FTIR de metimidazol, y derivados de cobre (II) con metimidazol.	64
Figura 13. Modos de coordinación para el anión carboxilato a un sitio metálico.	66
Figura 14. Espectros FTIR de (A) ácido DL-pGlu y (B) $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	67
Figura 15. Espectros Raman de (A) ácido DL-pGlu y (B) $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	68
Figura 16. Espectros experimentales y calculado FTIR para: (A) DMA, (B) $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y (C) $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	69

Figura 17. Estructuras resonantes de la DMA.	69
Figura 18. Espectro EPR experimental $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.	73
Figura 19. Susceptibilidad magnética del $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.	74
Figura 20. Espectros EPR banda X de polvo $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) (A) $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$. (B) $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4](3)$.	76
Figura 21. Espectro de reflectancia difusa $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	77
Figura 22. Espectro de reflectancia difusa $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.	78
Figura 23. Espectro de reflectancia difusa del ácido DL-pGlu y $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	78
Figura 24. Espectro de reflectancia difusa del $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	79
Figura 25. Estabilidad (espectro UV-Vis) de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	81
Figura 26. Espectro de EPR en solución de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	82
Figura 27. Estabilidad (espectro UV-Vis) de los complejos: (A) $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,25 \times 10^{-3}$ M) y (B) $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$.	83
Figura 28. Espectros de EPR en solución ((a) Experimental, (b) simulado): (A) $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y (B) $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$.	85
Figura 29. Estabilidad en solución (UV-Visible) para $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ (0,26 M) y ácido DL-pGlu.	87
Figura 30. (A) Titulación espectrofotométrica (UV-vis) del ácido DL-pGlu en N,N-dimetilacetamida (B) Determinación estequiométrica del complejo $\text{Mg(II)}:\text{DL-pGlu}$.	88
Figura 31. Espectros electrónicos UV-vis de DMA y de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	89
Figura 32. Espectros de absorción en $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: (A) calculado y (B) experimental.	90
Figura 33. Asignaciones calculadas para el espectro UV-vis simulado del MgDMA .	91

Capítulo 4.

Figura 1. Esquema de formación de tiroxina (T_4) y triiodotironina (T_3).	94
Figura 2. Síntomas y señales físicas en la enfermedad de Grave's.	95
Figura 3. Biosíntesis de hormonas tiroideas por medio de la enzima TPO.	96
Figura 4. Mecanismos de acción de actividad antitiroidea.	96
Figura 5. Mecanismo de formación del complejo entre el yodo y fármacos	99
Figura 6. Método de Lang: Espectro de absorción electrónica de I_2 y el sistema de $\text{I}_2-(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	100
Figura 7. Curva de inhibición de LPO por sertralina.	101
Figura 8. Método de Lang: Espectro de absorción electrónica UV-vis para el sistema $\text{I}_2-\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	102
Figura 9. Método de Lang: relación entre $Y = [\text{Ao}][\text{Do}]/dc$ vs $X = ([\text{Ao}] + [\text{Do}] - dc)/\epsilon c$ $\text{I}_2-\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	103
Figura 10. Método de la razón molar para complejo de TC $[\text{DMA}]-[\text{I}_2]$.	105
Figura 11. Espectro de absorbancia UV-vis e $[\text{DMA}]-[\text{I}_2]$.	105
Figura 12. Cambio de color por la formación de complejos de TC DMA- I_2 .	106
Figura 13. Curva $[\text{D}_0] \times [\text{A}_0] \times l / A$ vs $[\text{D}_0] + [\text{A}_0] / \epsilon$ del complejo de transferencia de carga DMA- I_2 a 453 nm.	107
Figura 14. Espectros FTIR de las soluciones de los sistemas DMA- I_2 (CCl_4).	108
Figura 15. Curva de relación molar: $[\text{I}_2]/[\text{MgDMA}]$.	109
Figura 16. (A) . Espectro de absorción electrónica de $[\text{I}_2]$ y $[\text{I}_2]:[\text{MgDMA}]$. (B) .	110

Cambio de color por la formación de complejos de TC MgDMA-I ₂ (DMF).	
Figura 17. Daño oxidativo por producción de EROs.	112
Figura 18. Sitio activo de la enzima superóxido dismutasa.	114
Figura 19. Porcentaje de la reducción de NBT por (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	120
Figura 20. Porcentaje de la reducción de NBT de los complejos derivados de cobre y metimidazol y Cu(II).	121
Figura 21. Efecto para complejos de Cu(II) y metimidazol sobre el radical DPPH [•] .	124
Figura 22. Estructura secundaria de la FAL.	127
Figura 23. Estructura del sitio activo de la FAc en mamíferos.	129
Figura 24. Estructura del sitio activo de Calciounerina.	129
Figura 25. Mecanismo catalítico para la actividad de la fosfatasa alcalina.	130
Figura 26. Efecto de los complejos de Cu(II) y metimidazol sobre la actividad de la fosfatasa ácida.	134
Figura 27. Curva de Lineweaver-Burk: $1/V = (K_m/V_{max}) / [S] + 1/V_{max}$ para la FAL.	137
Figura 28. Absorbancia vs tiempo de p-nitrofenol (PNP) a 405 nm ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Medidas cinéticas de la FAL.	138
Figura 29. Mecanismo de oxidación de las haloperoxidasas.	141
Figura 30. Bromación del rojo fenol, catalizada por los complejos de Cu(II).	142
Figura 31. Reacción de oxidación de pirogalol.	142
Figura 32. (A) Bromación oxidativa del rojo fenol por (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄] (B) Gráfica de $\ln([A]/[A_0])$ vs. Tiempo.	144
Figura 33. Bromación del rojo fenol catalizada por los complejos de cobre.	146
Figura 34. % Porcentajes de conversión vs tiempo para complejos de Cu(II) y metimidazol.	149
Figura 35. Oxidación del Pirogalol. Absorbancia (420 nm) <i>versus</i> tiempo y gráfica de Lineweaver-Burk: $1/V = K_m/V_{max}(1/[S] + 1/V_{max})$ para complejos de Cu(II) y metimidazol.	150

Capítulo 5.

Figura 1. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB-(SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	163
Figura 2. Gráfica de Stern-Volmer para el sistema (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄]- ASB a 298K y 310K.	164
Figura 3. Gráfica de $\log(F^0-F)/F$ vs $\log[M]$ para el sistema (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄]-ASB a 298K y 310K.	165
Figura 4. Espectro UV-Vis para el sistema (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄]-ASB.	167
Figura 5. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB-[Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂].2H ₂ O a 25 °C.	168
Figura 6. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB-[Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ 2H ₂ O] a 37 °C.	168
Figura 7. Curvas de Stern-Volmer F^0/F vs $[Q]$ y curva de $\log[(F^0-F)/F]$ vs $\log[Q]$ para los sistemas de ASB y complejos derivados de Cu(II) y metimidazol.	169
Figura 8. Banda X del espectro EPR del complejo [Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ H ₂ O].	171
Figura 9. Espectro de fluorescencia 3D de ASB, ASB - ácido DL-pGlu y ASB - Mg(DLpGlu) ₂ .	173
Figura 10. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB-[Mg(DMA) ₂ (H ₂ O) ₄]Cl ₂ .2H ₂ O.	175
Figura 11. A) Curva de Stern-Volmer F^0/F vs $Q [M]$ y B) Curva de $\log [(F^0-$	176

F)/F)] vs log[Q] para el sistema ASB-[Mg(DMA) ₂ (H ₂ O) ₄]Cl ₂ .2H ₂ O.	
Figura 12. Espectro UV/vis para la ASB y el sistema ASB-MgDMA.	177
Figura 13. Espectro de fluorescencia 3D para la ASB y el sistema ASB-MgDMA. Mapas de contorno correspondientes los puntos a λ_{em} : 365 nm; λ_{ex} : 215 nm.	178

Capítulo 6.

Figura 1. Síntomas clínicos de la depresión.	181
Figura 2. Síntesis de la serotonina.	185
Figura 3. Representación de una neurotransmisión serotoninérgica.	186
Figura 4. Sistema serotoninérgico.	187
Figura 5. Clasificación de los antidepresivos según su mecanismo de acción.	191
Figura 6. Mecanismos de acción de los antidepresivos.	192
Figura 7. Test de natación forzado (sertralina, CuCl ₂ y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	195
Figura 8. Prueba de campo abierto (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄] .	196
Figura 9. Variación de peso corporal de los animales (SerH ₂ Cl), CuCl ₂ y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	197
Figura 10. Prueba de Natación Forzada Mg(DL-pGlu) ₂ , MgCl ₂ y ácido DL-pGlu.	198
Figura 11. Prueba de campo abierto, Mg(DL-pGlu) ₂ , MgCl ₂ y ácido DL-pGlu.	199
Figura 12. Variación de peso corporal de los animales Mg(DL-pGlu) ₂ , MgCl ₂ y ácido DL-pGlu.	200
Figura 13. Prueba de la Placa caliente CuCl ₂ , SerH ₂ Cl y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	204
Figura 14. Prueba de campo abierto SerH ₂ Cl, CuCl ₂ y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	205
Figura 15. Variación de peso corporal de los animales SerH ₂ Cl, CuCl ₂ y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	206
Figura 16. Efecto analgésico de Mg(DL-pGlu) ₂ , MgCl ₂ y ácido DL-pGlu .	208

Capítulo 7.

Figura 1. Reacción enzimática de la FAL.	218
Figura 2. Prueba de natación forzada.	223
Figura 3. Prueba de campo abierto (PCA).	224
Figura 4. Diseño Experimental: PNF (prueba de natación forzada) y PCA (prueba de campo abierto).	226
Figura 5. Test de la platina caliente.	227

Índice de Tablas

Capítulo 2.

Tabla 1. Geometrías de coordinación posible para el cobre.	7
Tabla 2. Fórmula y Peso Molecular de la sertralina y clorhidrato de sertralina.	28

Capítulo 3.

Tabla 1. Datos cristalográficos de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	43
Tabla 2. Distancias [Å] y ángulos [°] de enlace para $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.	44
Tabla 3. Distancias [Å] y ángulos [°] de enlace para $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.	46
Tabla 4. Distancias (Å) y ángulos (°) en el enlace de hidrógeno del $(\text{SerH})_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.	48
Tabla 5. Distancias (Å) y ángulos (°) en el enlace de hidrógeno del $(\text{SerH})_2[\text{CuCl}_4]$.	48
Tabla 6. Datos de los cristales y resultados del refinamiento estructural para $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	50
Tabla 7. Distancias [Å] y ángulos de enlace [°], para el piroglutamato en $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	51
Tabla 8. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] del metal en $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	51
Tabla 9. Datos cristalográficos de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	55
Tabla 10. Distancias [Å] y ángulos de enlace [°] en torno al metal en $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	55
Tabla 11. Distancias de H [Å] y ángulos [°] de enlace para $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	56
Tabla 12. Bandas de FTIR: metimidazol, disulfuro de metimidazol, $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.	65
Tabla 13. Asignaciones tentativas del espectro FTIR y Raman del ácido DL-piroglutámico (DL-pGlu) y $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.	66
Tabla 14. Asignaciones vibracionales tentativas del espectro FTIR y Raman experimental y calculado para $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.	70

Capítulo 4.

Tabla 1. Valores de constante de formación (K_C), coeficiente de extinción. molar (ϵ) y cambio de energía libre estandar para el complejo DMA-iodo.	107
Tabla 2. Valores de IC_{50} y constantes cinéticas de actividad SOD de complejos de Cu(II).	122
Tabla 3. Resumen sobre la actividad FAc de los complejos derivados de Cu(II) y metimidazol.	135
Tabla 4. Actividad FAL: parámetros cinéticos de la FAL, de los sistemas FAL- $\text{Mg}(\text{II})$ y FAL- MgDMA .	138
Tabla 5. Parámetros cinéticos para la bromación del rojo fenol $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ ($2,5 \mu\text{M}$) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$ ($1 \mu\text{M}$).	147

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la actividad peroxidasa de compuestos de Cu(II).	148
Tabla 7. Parámetros cinéticos de la oxidación de pirogalol para [Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂].2H ₂ O(1) (1,7 μM) y [Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ H ₂ O](2) (20 μM).	151
Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima (CIM) para SerH ₂ Cl (sertralina), CuCl ₂ .2H ₂ O y (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	156
Tabla 9. Resumen de la parámetros de actividad SOD para complejos derivados de Cu(II).	157
Tabla 10. Resumen de los distintos mecanismos de actividad antitiroidea para los complejos derivados de Mg(II) y Cu(II).	158

Capítulo 5.

Tabla 1. Constante de unión aparente K _a , “n” sitios de unión y parámetros termodinámicos para el sistema de (SerH ₂) ₂ [CuCl ₄].	165
Tabla 2. Constante de unión aparente K _a , sitios de unión “n” y parámetros termodinámicos relativos del sistema a pH = 7: (A) [Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂].2H ₂ O (1)-BSA y (B) [Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ H ₂ O] (2)-BSA.	170
Tabla 3. Parámetros espectrales de fluorescencia 3D para los sistemas: ASB, ASB-ácido DL-pGlu y complejo ASB-Mg(DL-pGlu) ₂ .	173
Tabla 4. Parámetros termodinámicos, constante de Stern Volmer (K _{sv}), constante de unión aparente (K _a), “n” sitios de unión para el sistema ASB-[Mg(DMA) ₂ (H ₂ O) ₄]Cl ₂ .2H ₂ O.	176

Capítulo 7.

Tabla 1. Contribuciones de las fuerzas de interacción ABS-compuesto al ΔH y ΔS.	230
----------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPÍTULO 1

Objetivos

Capítulo 1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Este trabajo de tesis doctoral se abordó desde el punto de vista de la Química Inorgánica Medicinal, realizando un aporte en la búsqueda de potenciales fármacos, mediante la modificación química de fármacos comerciales con reconocida actividad antidepresiva y antihipertiroides. Esta modificación consistió en generar con los ligandos de interés farmacológico, complejos de coordinación metálicos con bioelementos (de preferencia Cu y Mg) que puedan eventualmente por medio de la modificación estructural potenciar y mejorar esta actividad.

De esta manera se estaría en condiciones de contribuir al desarrollo de nuevos compuestos con:

Mejor efecto farmacológico de interés a menores dosis

Mejor biodisponibilidad, con una buena relación costo-beneficio y sencillez de suministro de aquellos elementos y sustancias que ayuden al control efectivo de éstas enfermedades.

Nuevos compuestos que posean nuevas propiedades con actividad enzimáticas similar y con mejores efectos antioxidantes

1.2. Objetivos específicos:

Con el fin de abordar la investigación planteada, se proponen los siguientes objetivos:

(1) Planificar y sistematizar diferentes técnicas de síntesis de nuevos compuestos de coordinación modificando la estructura química de los ligandos por formación de complejos de coordinación o utilizando la estrategia de formación de co-cristales.

(2) Realizar una caracterización fisicoquímica de la estructura de los compuestos obtenidos tanto en fase sólida, en solución y simulando las condiciones fisiológicas.

(3) Evaluar las potenciales aplicaciones farmacológicas orientadas preferentemente hacia la actividad antidepresiva y antitiroidea.

(4) Para aquellos nuevos compuestos en los que puede demostrarse su efectividad farmacológica se realizarán estudios que permitan relacionar la importancia de las propiedades adquiridas por los compuestos preparados, con sus diferentes tipos de aplicaciones.

CAPÍTULO 2

Introducción

Capítulo 2. INTRODUCCIÓN

2.1. Complejos de coordinación

La Química de Coordinación constituye uno de los campos más importantes de la Química Inorgánica, no sólo por su amplitud y complejidad sino también por el gran volumen de investigación que se le dedica. Esta importancia se ve incrementada debido a su contribución al desarrollo de otras áreas de la Química. Un ejemplo de ello lo constituyen ciertos compuestos de coordinación que desempeñan un papel crucial en procesos biológicos de interés, lo cual ha originado la denominada Química Bioinorgánica.

El impulso de la Química de Coordinación se debe en gran parte al desarrollo en el campo teórico, en los métodos de síntesis y en el campo de las aplicaciones de los compuestos de coordinación.

Así, la introducción de la teoría del campo de los ligandos, que incluye a su vez la teoría del campo cristalino y aspectos mecánico-ondulatorios que permiten describir, mediante enlaces policéntricos, las uniones metal-ligando, consigue resolver problemas relacionados con la estructura, la naturaleza del enlace y la estabilidad de los compuestos de coordinación. Además, la teoría del funcional de la densidad (DFT) permite un conocimiento más profundo de la estructura electrónica de los compuestos de coordinación. Al mismo tiempo, está siendo utilizada para calcular parámetros espectroscópicos, predecir estructuras con precisión y comprender la reactividad química.

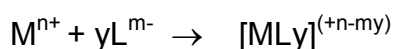
La ampliación y mejora de los métodos de síntesis, unido a la aplicación de distintos métodos de purificación, como extracción, cromatografía en capa fina y en columna, intercambio iónico, sublimación a vacío, etc., ha hecho posible la síntesis de especies complejas cuya obtención no se hubiera realizado de no contar con tales medios.

Por otra parte, el desarrollo de numerosos métodos experimentales, como las técnicas espectrofotométricas, ópticas, eléctricas, magnéticas, térmicas, de difracción, etc¹, ha permitido el estudio de la estequiometría, estabilidad, estructura y propiedades de los complejos.

Un compuesto de coordinación está conformado por un *átomo o ion metálico central*, rodeado por un número de iones, átomos o moléculas, que reciben el nombre de *ligandos* (Figura 1). Estos compuestos presentan distintas propiedades dependiendo tanto de las características del ión metálico como de la naturaleza de los ligandos.

La formación de un compuesto de coordinación se puede interpretar como una reacción entre un ácido de Lewis y una base de Lewis, entre los que se establece un enlace covalente coordinado o dativo.

¹ A.B.P Lever. *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Vol. 2, (J.A McCleverty, T.J Meyer, Eds.), Elsevier Pergamon, New York. **2004**.



La formación de un complejo de coordinación está determinada fundamentalmente por la carga, tamaño y configuración electrónica del ión metálico. Generalmente cuanto mayor es la relación entre la carga y el tamaño (Z/r) del ion central, mayor estabilidad presenta el compuesto de coordinación.

En cambio, para el ligando, el aspecto principal que favorece la formación está determinado por la basicidad de sus átomos dadores. Se sabe que a mayor fuerza del grupo ligando como base, mayor será su tendencia a formar complejos estables². Los ligandos con dos o más átomos donadores forman quelatos, especies complejas más estables debido al efecto más favorable en la variación de entropía asociada a su formación.

Aquellos complejos que poseen ligandos mixtos (complejos ternarios), son de gran interés ya que se hallan presentes en los sistemas biológicos y por otra parte presentan alta estabilidad.

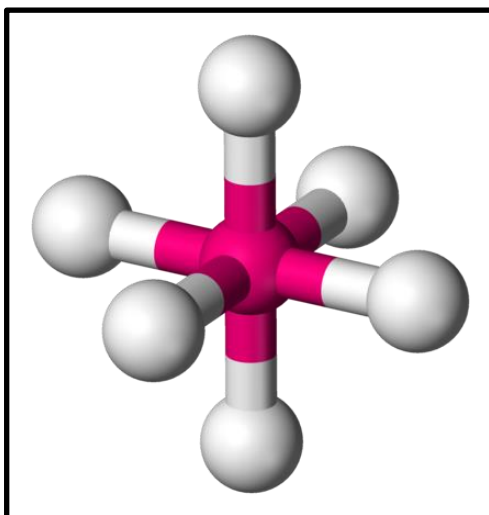


Figura 1. Representación de un complejo de coordinación de geometría octaédrica. En color rosa el metal central, en gris claro, los ligantes.

2.1.2. Aplicaciones biomédicas de los compuestos de coordinación

Las moléculas inorgánicas y los compuestos de coordinación de iones metálicos esenciales (bioelementos) son necesarias para la vida en muchos organismos y sistemas biológicos, ya que funcionan en el transporte de moléculas y son un componente clave de las enzimas.

Los metales constituyen una fracción importante de los elementos esenciales para la vida. Por lo tanto, la química de coordinación, en el sentido de que es en gran medida la química de los cationes metálicos, subyace en muchos de los procesos biológicos más fundamentales. Así, es bien conocido que en los procesos bioquímicos intervienen numerosas especies complejas en las que

² J. Ribas Gispert. *Química de coordinación*. Ediciones Omega. S.A. Barcelona. **2000**.

los ligandos son biomoléculas esenciales para la vida, tales como las porfirinas, que dan lugar a complejos con metales, por ejemplo Fe(II) y/o Fe(III) (hemoglobina Fe(II), peroxidasa Fe(II)/Fe(III)). Además los cationes metálicos esenciales establecen enlaces e interacciones con biomoléculas (fundamentalmente con las proteínas y los ácidos nucleicos) siendo con frecuencia los responsables del mantenimiento de su estructura tridimensional y de su función biológica.

El uso de los complejos de coordinación en el campo médico y farmacológico da cuenta de la utilización de diferentes ligandos con fines terapéuticos, usados en los casos de envenenamiento por metales ya que forman complejos quelatos estables, solubles y no tóxicos.

La unión de un metal a un fármaco orgánico puede modificar significativamente su actividad (mecanismo de acción, características farmacocinéticas, selectividad, citotoxicidad)³.

Uno de los grandes éxitos de los compuestos de metales de transición es el cisplatino (Figura 2).

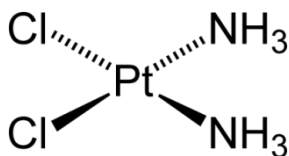


Figura 2. Cisplatino.

Este compuesto, con una estructura muy simple es uno de los medicamentos más exitosos contra el cáncer ganando rápidamente la aprobación clínica en 1978. Su efectividad se basa en su modo de acción. Una vez que el cisplatino logra atravesar las membranas celulares y llegar hasta el núcleo de una célula cancerosa puede interactuar de forma directa con el ADN de forma que puede inhibir la proliferación de las células enfermas. El ión $\text{cis-[PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ puede unirse covalentemente luego de la disociación de los ligandos lábiles cloruro, a las bases nitrogenadas del ADN (la especie activa es el *cis*-diacuodiaminoplatino(II)). Estas moléculas de agua son reemplazadas finalmente cuando el complejo se liga en algún sitio específico del ADN. Para estas uniones existen varios sitios de coordinación posibles: como los átomos de oxígeno de los grupos polifosfatos cargados negativamente, y/o los átomos de N y O de las bases nucleicas⁴ específicamente guanina y adenina (Figura 3). Finalmente con la formación del aducto cisplatino-ADN, las vías celulares son alteradas afectando la replicación, transcripción y reparación del ADN, el ciclo celular y ocasionando la muerte por apoptosis.

³ C Jones, J.R Thornback. *Med App of Coord Chem*. United Kingdom. **2007**.

⁴ E.J Baran. *Química Bioinorgánica*. McGraw-Hill. España. **1995**.

Los compuestos de platino que se usan hoy en día se encuentran entre los tres medicamentos más recetados contra el cáncer. El éxito atribuido al Cisplatino ha renovado el interés de la comunidad científica en diseñar medicamentos a base de metales.

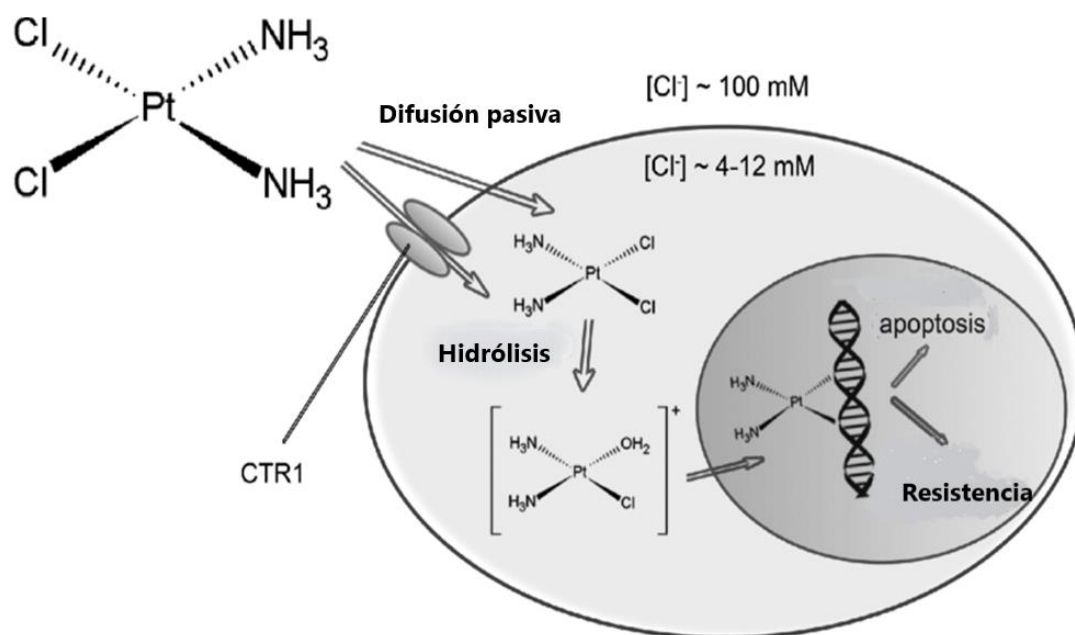


Figura 3. Mecanismo de acción del cis-platino⁵.

Desde el punto de vista de las relaciones entre la Bioinorgánica y la Farmacología, es indispensable el estudio estructural y funcional de las metalobiomoléculas entre las que se podrían destacar las metaloenzimas, para dilucidar los mecanismos de acción, metabolismo y excreción de los fármacos.

Las investigaciones sobre metaloenzimas han experimentado un auge extraordinario en los últimos años⁶. De estos estudios se concluye que la actividad específica de estas especies está íntimamente relacionada con la estructura de sus centros activos. Dichos centros se caracterizan por contener cantidades estequiométricas de uno o varios elementos metálicos, y son considerados como complejos de coordinación en los cuales los metales están unidos de forma estratégica a determinados grupos funcionales de los ligandos. La relación entre las propiedades de algunos complejos de coordinación de tipo sintético y las observadas en determinadas metaloenzimas, ha permitido a los químicos orgánicos el diseño y preparación de especies de bajo peso molecular capaces de realizar transformaciones similares a las que ocurren en los seres vivos⁷.

⁵ J.R Browning, P.J.T Reardon, M. Parhizkar, R.B Pedley, M. Edirisinghe, J.C Knowles, E. Stride. *Am Chem Soc.* **2017**. 119, 8560-8578.

⁶ S. Otsuka; T. Yamanaka. *Metalloproteins*. Elsevier. **1988**. Vol 8.

⁷ J. Ibers, R. Holm. *Science*. **1980**. 204, 44-53.

Los complejos de cobre presentan una amplia gama de actividad farmacológica, tales como antibacteriana^{8,9}, antifúngica^{10,11,12} y antioxidante¹³.

Debe señalarse que algunos complejos de cobre han demostrado ser útiles para generar fármacos con un amplio espectro de acción terapéutica. Además varios complejos de cobre(II) han sido ampliamente estudiados como fármacos antiinflamatorios, demostrando que la actividad de este tipo de compuestos es superior a la de los ligandos cuando estos la presentan, o se genera cuando el ligando no la posee. Esto es especialmente interesante ya que parece posible que la actividad antiinflamatoria de ciertas sustancias orgánicas tenga su origen en la formación preliminar *in vivo* de los correspondientes complejos de cobre¹⁴. Además estos compuestos poseen actividad antiulcerosa y una menor toxicidad que otras formas inorgánicas del cobre.

El efecto farmacológico no se observa al administrar el ligando aislado o compuestos inorgánicos de cobre, por lo que probablemente estos complejos de cobre faciliten la absorción y/o la distribución del metal en los sistemas biológicos

2.2. Los Metales: El rol en la medicina

Los iones metálicos son necesarios para muchas funciones bioquímicas críticas en los seres humanos. La escasez de algunos iones metálicos puede conducir a una determinada enfermedad. Por ejemplo, la anemia perniciosa resultante de la deficiencia de hierro¹⁵, el retraso del crecimiento derivado de la dieta insuficiente de zinc¹⁶ y enfermedades del corazón en los lactantes debido a la deficiencia de cobre^{17,18}. La capacidad de reconocer, comprender a nivel molecular, y el tratamiento de enfermedades causadas por la función inadecuada de iones metálicos constituye un aspecto importante de química bioinorgánica medicinal.

También los iones metálicos pueden inducir toxicidad en los seres humanos, siendo como ejemplos clásicos las intoxicaciones de los metales pesados como el mercurio y el plomo^{19,20}.

⁸ J. Gao, X.Y Xu, W.X Ma, M.Y Wang, H.B Song, X.J Yang, L.D Lu, X. J Wang. *Coord Chem.* **2004.** 57, 1443-1561.

⁹ B.S Creaven, D.A Egan, K. Kavanagh, M. McCann, A. Noble, B. Thati, M. Walsh. *Inorg Chim Acta.* **2006.** 359, 3976-3984.

¹⁰ T.C White, K.A Marr, R.A Bowden. *Clin Microbiol Rev.* **1998.** 11, 382-402.

¹¹ K.M Br Abu Salah. *J Biomed Sci.* **1996.** 53, 122-133.

¹² K. Kavanagh, A. Eshwika, B. Coyle, M. Devereux, M. McCann. *Biometals.* **2004.** 17, 415-422.

¹³ F. Dimiza, F. Perdih, V. Tangoulis, I. Turel, D.P Kessissoglou, G. Psomas. *J Inorg Biochem.* **2001.** 105, 476-489.

¹⁴ J. Sorenson. *Med Scien.* **1982.** Little Rock, Arkansas.

¹⁵ G.J Handelman, N.W Levin. *Heart Fail Rev.* **2008.** 13, 393-404.

¹⁶ D.A Phipps. *Oxford University press.* **1976.** 63.

¹⁷ R. Nath. *Int J Biochem Cell Biol.* **1997.** 29, 1245-1254.

¹⁸ A. Ashkenazi, S. Levin, D. Mjaldetti, E. Fishel, D. Benvenisti. *Pediatrics.* **1973.** 52, 525-533.

¹⁹ A. Ala, A.P Walker, K. Ashkan, J.S Dooley, M.L Schilsky. *Lancet.* **2007.** 369, 397-408.

²⁰ N.C Papanikolaou, E.G Hatzidaki, S. Belivanis, G.N Tzanakakis, A.M Tsatsakis. *Med Sci Monit.* **2005.** 11, 329-336.

Incluso los iones metálicos esenciales pueden ser tóxicos cuando están presentes en exceso. Por ejemplo, el hierro es un tóxico común en el hogar como resultado de la ingestión accidental, por lo general en los niños del suplemento dietético sulfato ferroso²¹. La comprensión de la bioquímica y la biología molecular de los recursos naturales de los iones metálicos, sus mecanismos de desintoxicación y el diseño y la aplicación de un agente quelante de iones específicos para el tratamiento de las intoxicaciones con metales, son dos componentes de un segundo aspecto importante de la nueva ciencia que se está desarrollando en la interfaz de la química bioinorgánica y la medicina.

2.2.1. Aspectos de la química del Cu(II)

2.2.1.2. Estados de oxidación y geometría

El cobre es un metal de la primera serie de transición de configuración electrónica $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$. Presenta variados estados de oxidación desde 0 hasta +4, predominando el estado de oxidación +2. Del bloque d de elementos en la primer serie de metales de transición, es el único con estado de oxidación +1 estable, excepto en medio acuoso. El Cu(I) o ion cuproso, presenta una configuración electrónica d^{10} de capa llena.

Su química de coordinación es muy variada así como su geometría. En la Tabla 1 se muestran algunos de los principales estados de oxidación, junto a las geometrías posibles para sus complejos de coordinación.

Tabla 1. Geometrías de coordinación posible para el cobre.

Geometría	Estado de oxidación (configuración electrónica)	Número de Coordinación
Lineal	Cu(I) (d^{10})	2
Trigonal plana		3
Tetraédrica		4
Tetraédrica o plano cuadrada	Cu(II) (d^9)	4
Bipirámide trigonal o pirámide cuadrada		5
Octaédrica distorsionada		6
Plano cuadrada	Cu(III) (d^8)	4
Bipirámide trigonal		5
Octaédrica		6

En su estado de oxidación (II) el cobre forma fácilmente complejos de coordinación con una gran variedad de ligandos (inorgánicos y orgánicos) y geometrías posibles. Dada su configuración electrónica d^9 presenta el efecto Jahn-Teller²² con una ganancia en estabilidad ya que el Cu(I) se oxida

²¹ J.W Eaton, M. Qian. *Free Rad Biol Med.* **2002.** 32, 833-840.

²² R.C Conry. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry.* **2005** (Second Edition). Prof. R. Bruce King (Ed.).

fácilmente a Cu(II) y el estado de oxidación Cu(III) resulta difícil de obtener^{23,24}. Este estado de oxidación le confiere al Cu(II) relevancia en el campo medicinal y para otras aplicaciones. Dado su electrón desapareado los compuestos de Cu(II) son paramagnéticos de color azul o verde²⁵, y sólo en casos de presencia de transferencias de carga pueden presentar color rojo, marrón e incluso amarillo.

Los complejos de Cu(II) presentan una gran variedad de distorsiones estructurales respecto de las geometrías regulares^{24,26}. Esto es debido a que su estereoquímica está fuertemente influenciada por la distorsión Jahn-Teller, que es consecuencia de la ocupación desigual del par de orbitales e_g (d_z^2 y $d_{x^2-y^2}$) al someter a un ion d^9 a un campo cristalino octaédrico. En ocasiones, esto conduce a una compresión del octaedro con dos enlaces cortos y cuatro largos, sin embargo, la distorsión típica consiste en una elongación del octaedro con cuatro enlaces cortos y dos largos. En una situación extrema la distorsión es tal que conduce a la pérdida completa de los ligandos axiales, dando lugar a un complejo plano-cuadrado^{22,27,28} y, en consecuencia, la distinción entre las geometrías octaédrica con distorsión tetragonal y plano-cuadrada resulta compleja.

En general, en los complejos de coordinación el cobre(II) se encuentra en un entorno de coordinación tetragonal, con 4 enlaces cortos en el plano ecuatorial y uno o dos enlaces más largos en el plano axial²⁹.

Las geometrías de coordinación comunes complejos de Cu(II) de coordinación 6 es la octaédrica con elongación tetragonal^{30,31} o rómbica^{32,33}. Para complejos con número de coordinación 5, predomina la geometría piramidal cuadrada con elongación tetragonal unida a una distorsión trigonal en el plano de la base de la pirámide y la geometría bipiramidal trigonal, frecuentemente distorsionada hacia una pirámide de base cuadrada^{34,35}.

Como se mencionara, el estado de oxidación (III) no es estable y se forma por la reacción de Cu(II) en presencia de un agente oxidante como H_2O_2 . Se sabe

²³ B.J Hathaway. *Comprehensive Coordination Chemistry: the synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds*, Eds. G. Wilkinson, R.D Gillard, J.A McCleverty, Pergamon Press, Oxford. **1987**. 5, 533.

²⁴ F.A Cotton, G. Wilkinson, C.A Murillo, M. Boschmann. *Advanced Inorganic Chemistry*, 6ª Ed., John Wiley & Sons. Nueva York. **1999**.

²⁵ J.D Lee. *Concise Inorganic Chemistry*, 4ª Ed., Chapman & Hall. Londres. **1991**.

²⁶ B.J Hathaway. *Struct Bonding*. **1984**. 57-55.

²⁷ N.N Greenwood, A. Earnshaw. *Chemistry of the Elements*, 2ª Ed. Oxford, Butterworth-Heinemann. **1997**.

²⁸ A.G Massey. *Comprehensive Inorganic Chemistry*. Pergamon Press. Oxford. **1973**. 3,1.

²⁹ R.C Conry, Copper: *Inorganic and Coordination Chemistry*, in Encyclopedia of Inorganic Chemistry. **2005**.

³⁰ K. Kurdziel, T. Glowiak. *Trans Met Chem*. **1999**. 24, 366-369.

³¹ L. Forti, L. Menabue, M. Saladini. *J Chem Soc Dalton Trans*. **1991**. 11, 2955-2959.

³² S. Youngme, N. Chaichit, K. Damnatara. *Polyhedron*. **2002**. 21, 943-950.

³³ L. Antolini, L.P Battaglia, A. Bonamartini Corradi, G. Marcotrigiano, L. Menabue, G.C Pellacani, M. Saladini, M. Sola. *Inorg Chem*. **1986**. 25, 2901-2904.

³⁴ Y. Yamada, H. Sakurai, Y. Miyashita, K. Fujisawa, K. Okamoto. *Polyhedron*. **2002**. 21, 2143-2147.

³⁵ B. Macias, I. García, M.V Villa, J. Borrás, M. González-Álvarez, A. Castiñeiras. *Inorg Chim Acta*. **2003**. 353, 139-144.

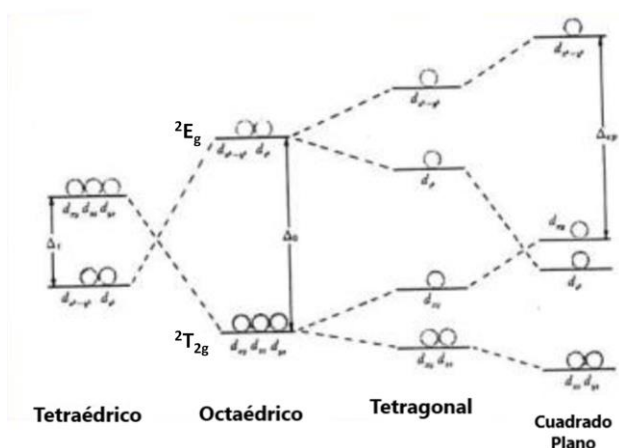
que existe Cu(III) como partícipe de algunas en reacciones en procesos biológicos que involucran cuproenzimas y donde intervienen péptidos como ligandos³⁶.

2.2.1.3. Espectros electrónicos característicos para cobre(II)

Se sabe que el Cu(II) ([Ar]3d⁹) presenta un término espectral ²D en la formación de complejos. En presencia de un campo de ligandos, este término se desdobla para dar distintos niveles, cuyo número y energía depende del tipo de ligandos, del número de coordinación y de la geometría adoptada por el complejo³⁷.

En la Figura 4(A) se presentan los desdoblamientos de orbitales d para entornos tetraédrico, octaédrico, distorsión tetragonal y cuadrado plano. Puede observarse que para un campo de ligandos idealmente octaédrico, dicho término se desdobla en dos niveles: ²E_g y ²T_{2g}. Los 9 electrones d del cobre (Cu(II)) se distribuyen entre los 5 orbitales d, quedando un lugar vacío en uno de los orbitales de mayor energía (Figura 4(B)). La presencia de un solo electrón en los orbitales e_g, da lugar a la distorsión conocida como efecto de Jahn Teller, esto provoca una elongación tetragonal a lo largo del eje z y a una contracción en el plano ecuatorial si el electrón desapareado se encuentra en el orbital d_{z²} (o viceversa si el electrón impar se encuentra en el orbital d_{x²-y²})³⁸. originando una geometría octaédrica elongada o comprimida del cubo, según el eje z respectivamente, generando un prisma tetragonal.

(A)



(B)

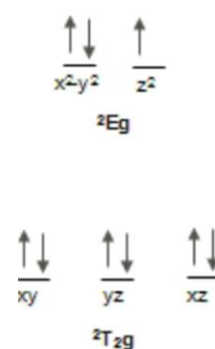


Figura 4. (A) Desdoblamiento de orbitales d para entornos tetraédricos, octaédrico, distorsión tetragonal y cuadrado plano; (B) Distribución de electrones para un entorno octaédrico de Cu(II).

Si se recorre la bibliografía característica de la química bioinorgánica se encuentran en todas ellas la clasificación de las proteínas de cobre en función

³⁶ G. Hogarth, A. Pateman, S.P Redmon. *Inorg Chim Acta*. **2000**. 306, 232-236.

³⁷ B.J Hathaway, D.E Billing. *Coord Chem Rev*. **1970**. 5, 143-207.

³⁸ E.I Solomon. *Inorg Chem*. **2006**. 45, 8012-8025.

de las características espectroscópicas de los centros de Cu(II) de sus sitios activos. Así la clasificación se propone de la siguiente⁴.

a) **Cobre tipo 1:** el cobre de este tipo presenta una estructura altamente distorsionada, y es el que imparte el color característico a las denominadas “proteínas azules”. Esta fuerte coloración azul se debe a una banda de absorción intensa en la zona del rojo de su espectro electrónico en la región del visible como consecuencia de la transferencia de carga S(Cisteína)→Cu(II). Es paramagnético, pero su espectro de resonancia paramagnética electrónica (RPE) posee características poco comunes, al igual que ocurre con el valor de su potencial redox.

b) **Cobre tipo 2:** también llamado cobre normal, es paramagnético y consiste en un centro mononuclear que presenta espectros electrónicos y de RPE típicos de complejos de Cu(II) con una coordinación tetragonal.

c) **Cobre tipo 3:** consiste en un centro dinuclear de cobre con un fuerte acoplamiento antiferromagnético, lo que torna diamagnético al sistema y, por lo tanto, no permite su detección por espectroscopía RPE. Estos sistemas se caracterizan por presentar una banda de absorción muy intensa alrededor de los 300 nm.

2.2.1.4. Espectro Infrarrojo (FTIR)

Como se sabe, la espectroscopía infrarroja permite identificar, las bandas características para cada tipo de ligando así como las frecuencias de estiramiento típico derivados del enlace del cobre al ligando.

Este tipo de frecuencias de estiramientos relacionadas con el centro metálico en los complejos de coordinación se muestran en la región baja del espectro infrarrojo, y en el infrarrojo lejano.

En términos generales se pueden mencionar los estiramientos Cu-S, Cu-N y Cu-O. La frecuencia de estiramiento del enlace Cu-S aparece alrededor de 310 cm^{-1} ,³⁹ mientras que la correspondiente al enlace Cu-N se encuentra a frecuencias ligeramente mayores (ej: 407 cm^{-1} ,⁴⁰ 420 cm^{-1} ,³⁸) por tener menor masa. El estiramiento Cu-O se presenta comúnmente a mayores frecuencias que los anteriores (450 cm^{-1})⁴¹, aunque en complejos que presentan una alta resonancia el estiramiento Cu-O se observa a frecuencias mucho mayores (603 cm^{-1})⁴².

³⁹ C. Urquiola, D. Gambino, M. Cabrera, M. Lavaggi, L.H Cerecetto, M. González, de A.L Cerain, A. Monge, A.J Costa-Filho, M.H Torre. *J Inorg Biochem.* **2008.** 102, 119-126.

⁴⁰ S. Banerjee, S. Mondal, W. Chakraborty, S. Sen, R Gachhui, R.J Butcher, A.M.Z Slawin, C. Mandal, S. Mitra. *Polyhedron.* **2009.** 28, 2785-2793.

⁴¹ R.M.T Torre, E. Friet, I. Viera, E. Kremer, E.J Baran. *Acta Farm Bonaer.* **1993.** 12, 73-77

⁴² S.B Bukhari, S. Memon, M. Mahroof-Tahir, M.I Bhanger. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2009.** 71, 1901-1906.

2.3. Aspectos biológicos del cobre

2.3.1. Importancia biológica del cobre

El cobre es un mineral traza, esencial que se halla presente en la mayoría de los sistemas vivos y es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, luego del hierro y el Zn. El origen de esta dependencia del cobre se remonta al “Gran Acontecimiento de Oxigenación de la Tierra”, hace aproximadamente 2.700 millones de años, cuando los niveles de oxígeno comenzaron a aumentar⁴³ por la presencia de organismos fotosintéticos como las cianobacterias, el oxígeno acumulado en la atmósfera y la consecuente oxigenación de los océanos. Esto condujo a una disminución en la solubilidad del Fe y una expansión del papel biológico del Cu.

La forma química en la que se encuentra en los organismos vivos es tanto en estado oxidado Cu(II) como en el estado reducido Cu(I). Actúa como un importante cofactor catalítico por su capacidad redox y su potencial de complejación que lo hace indispensable para muchas funciones biológicas fundamentales requeridas para el crecimiento y el desarrollo de los individuos.

Desde 1920 este elemento es reconocido como un nutriente esencial ya que sus sales eran capaces de corregir anemias causadas por déficit alimentario. La dieta promedio de los humanos adultos contiene Cu en una concentración que varía entre 0,6 y 1,6 mg/día.

Mariscos, semillas, granos y nueces son los alimentos que poseen mayor concentración de Cu, mientras que frutas, verduras y carne poseen menor concentración. Si se elimina el germen y el salvado de cualquier grano el contenido de cobre se reduce, como es el caso de la harina de trigo estándar. El agua dulce no contaminada contiene escasa concentración de Cu pero el agua de mar posee mayor cantidad y dicho valor aumenta con la profundidad, lo que explica la alta concentración de Cu en pescados y mariscos que habitan en el fondo oceánico.

2.3.2. Cobre como pro-oxidante

La utilidad biológica del cobre se deriva principalmente de su aptitud para cambiar entre la forma oxidada (Cu(II)) y la forma reducida (Cu(I)). Los efectos ejercidos por metales como cobre y hierro se deben a que presentan estados de oxidación variables que dependen notablemente de la forma predominante del metal, del potencial redox y el entorno de coordinación. La captación de cobre y los efectos oxidativos intracelulares son causados, principalmente, por el ión cúprico mientras que los efectos sobre el transporte de membrana son debidos al ión cuproso que probablemente se forma allí mismo, donde los grupos sulfhidrilo actúan como agentes reductores. Se supone que el Cu(I) se encuentra en la membrana celular y dentro de la célula y su potencial redox es más bajo que en sangre.

⁴³ A.G Dalecki, L. Crawford, F. Wolschendorf. *Adv Microb Physiol.* **2017.** 70, 193-260.

Los mecanismos bioquímicos y celulares por los cuales el cobre puede producir daño o necrosis celular aún se están debatiendo. Una de las hipótesis consiste en que un exceso de cobre podría disparar el daño celular peroxidativo por producción de especies reactivas del oxígeno (EROS o ROS, en inglés) con el consecuente daño oxidativo.

En hepatocitos incubados con altas concentraciones de Cu(II) se ha identificado a los lisosomas como principal sitio de producción de EROs mientras que otro estudio realizado con microscopio de barrido confocal indica que la producción de EROs ocurre en la mitocondria, la cual juega un papel fundamental en la muerte celular por apoptosis⁴⁴.

El cobre puede participar en diversas reacciones radicalarias, incluyendo:

(i) conversión del anión radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno (dismutación)



(ii) conversión de peróxido de hidrógeno en radical hidroxilo



(iii) conversión de tiol (R-SH) en radical tiol (RS•)

Como ya hemos visto, la formación de estos radicales es responsable de la peroxidación lipídica de membranas, oxidación directa de proteínas, ruptura de ADN y ARN. Además de participar en la generación de EROs, el cobre puede manifestar su toxicidad a través del desplazamiento de otros cofactores metálicos de sus sitios de unión con ligandos naturales. Por ejemplo, el reemplazo de Cu(II) por Zn(II) en los sitios de unión al ADN de los dedos de Zn pertenecientes a los receptores de estrógenos da lugar a una proteína defectuosa, alterando su papel en la vía de transducción de señales⁴⁵.

2.3.3. Enzimas dependientes de cobre

El cobre se encuentra presente en una gran variedad de enzimas intracelulares y extracelulares las cuales están implicadas en numerosos procesos metabólicos. Así por ejemplo, la mayoría de las deficiencias de cobre pueden ser explicadas por el fallo de una o más enzimas dependientes de ese metal.

La mayor parte del cobre en el cuerpo humano, se encuentra formando parte de enzimas redox, estando involucrado como cofactor. Las enzimas más

⁴⁴ G. Crisponi, V. Ma. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa. *Coord Chem Rev.* **2010.** 254, 876-889.

⁴⁵ L.D Quarles, D.A Yohay, L.W Lever, R. Caton, R.J Wenstrup. *J Bone Miner Res.* **1992.** 7, 683-692.

conocidas son: la ceruloplasmina que es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre⁴⁶, la citocromo c oxidasa, que es la enzima terminal de la cadena transportadora de electrones; la superóxido dismutasa (SOD de Cu y Zn) que es una enzima antioxidante capaz de remover los radicales superóxido de los tejidos⁴⁷.

2.3.4. Cobre y enfermedades asociadas

El nivel de cobre intracelular (regulación de la captación, transporte y excreción) se encuentra altamente controlado^{48,49,50}. Así, los defectos en la homeostasis del cobre, dan lugar a la aparición de patologías genéticas, como la enfermedad de Wilson⁵⁰, o la de Menkes^{51,49}, Diabetes mellitus⁵², enfermedad de Alzheimer⁵³, y a defectos estructurales y funcionales cardiovasculares, en el metabolismo de los huesos y de las enfermedades musculares⁵⁴.

Como todo elemento esencial también puede ser tóxico sin embargo es poco frecuente en los seres humanos la toxicidad debida a un exceso de cobre en la dieta.

2.3.4.1. Enfermedades genéticas:

Se conocen dos anormalidades genéticas relacionadas con el metabolismo del cobre: la enfermedad de Menkes y la enfermedad de Wilson.

Un resumen de las principales vías del cobre en el organismo y sus puntos de bloqueo se muestran en la Figura 5.

⁴⁶ G. Musci, F. Polticelli, L. Calabrese. *Copper Transport and Its Disorders*. **1999**. 448, 175-182.

A. Leone, Arturo, J.F.B. Mercer, Julian F.B. (Eds.)

⁴⁷ M. Linder, M. Hazegh-Azam. *Am J Clin Nutr*. **1996**. 63, 797-811.

⁴⁸ H. Kodama, Y. Murata, M. Kobayashi. *Pediatr Int*. **1999**. 41, 423-429.

⁴⁹ H. Kodama, C. Fujisawa. *Metallomics*. **2009**. 1, 42-52.

⁵⁰ M.C Linder. *New York Plenum Press. Biochemistry of copper*. **1991**.

⁵¹ J.Y Uriu-Adams, C.L Keen. *Mol Aspects Med*. **2005**. 26, 268-298.

⁵² K.O Lewis. *Gut*. **1973**. 14, 221-232.

⁵³ D.L De Romaña, M. Olivares, R. Uauy, M.J Araya. *Trace Elem Med Biol*. **2011**. 25, 3-13.

⁵⁴ L. Gaetke. *Toxicology*. **2003**. 189, 147-163.

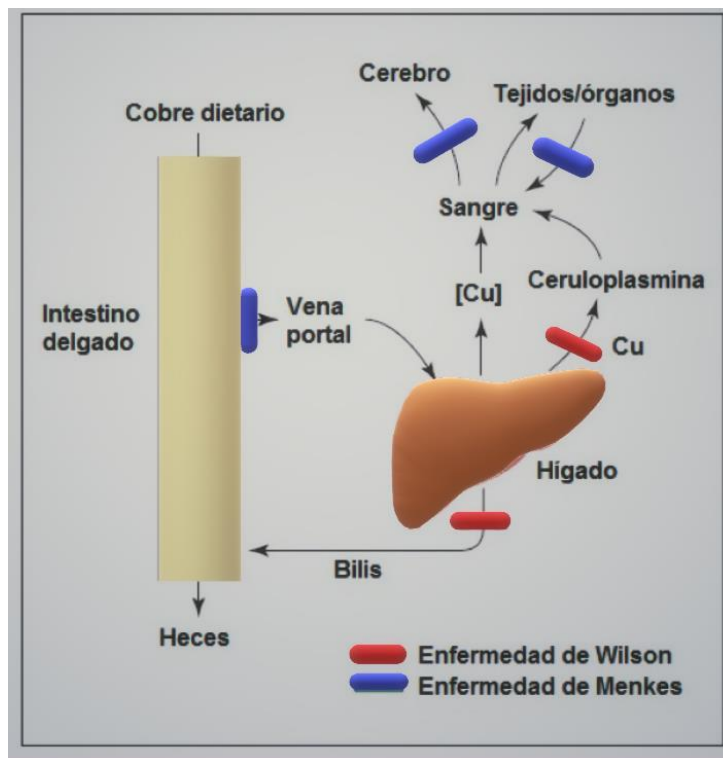


Figura 5. Vías del cobre en el cuerpo y los bloqueos de las enfermedades de Wilson y Menkes. Los eritrocitos absorben el cobre en el intestino delgado y difunden a través de la superficie basolateral de esas células. Este último proceso es defectuoso en pacientes con la enfermedad de Menkes, lo que resulta en una acumulación de cobre en los eritrocitos en conjunto con una deficiencia de cobre en el cuerpo. En condiciones normales, el hígado toma la mayor parte del Cu recién absorbido, mientras que, en caso de exceso en el consumo de cobre, se excreta por la bilis. Este proceso se encuentra bloqueado en la enfermedad de Wilson, así como también la entrega de cobre a la ceruloplasmina, la principal proteína transportadora de cobre en la sangre. El transporte de cobre al cerebro está bloqueado en pacientes con la enfermedad de Menkes, lo que genera las anomalías neurológicas severas, características de esta enfermedad⁵⁵.

- **Enfermedad de Menkes:**

Esta enfermedad deriva de la disfunción de varias enzimas dependientes de cobre. Se producen mutaciones en el gen (ATP-7A) que es el que codifica la proteína intracelular ATPasa de tipo P transportadora de cobre. La sintomatología se refiere a retraso del crecimiento intrauterino, deterioro neurológico progresivo, convulsiones, hipotermia, las que aparecen durante los primeros meses de vida.

También se la conoce como el “síndrome del cabello ensortijado” debido al aspecto del mismo⁵⁶. Pacientes que padecen esta enfermedad presentan niveles reducidos de cobre hepático, urinario y sérico y disminución de la absorción de cobre⁵⁷.

- **Enfermedad de Wilson:**

⁵⁵ J.F Mercer. *Trends Mol Med.* **2001.** 7, 64-69.

⁵⁶ Z. Tumer, L.B Moller. *Eur J Hum Genet.* **2010.** 18, 511-518.

⁵⁷ D. Danks, P. Campbell, B. Stevens, V. Mayne, E. Cartwright. *Pediatrics* .**1972.** 50, 188-201.

Es un trastorno hereditario del metabolismo del cobre. Se sabe que se producen mutaciones en el gen ATP-7B que codifica para una ATPasa tipo P implicada en el transporte de cobre dentro del hepatocito. Cuando esto ocurre, existe una acumulación progresiva de cobre, primero en el hígado y posteriormente en el encéfalo y en otros tejidos, con manifestaciones clínicas principalmente hepáticas, neurológicas, psiquiátricas y oftalmológicas. En ausencia de tratamiento, esta enfermedad progresa hacia la muerte debido a los efectos tóxicos por daño oxidante⁵⁸.

2.3.5. Rol del cobre(II) en la depresión

El cobre es un metal esencial que está presente en el cerebro humano y es liberado desde vesículas sinápticas a continuación de la fase de despolarización neuronal. Este metal se ha encontrado en diferentes áreas en el sistema nervioso central (cerebelo, hipocampo, ganglios basales, sobre las membranas sinápticas, etc)⁵⁹. Se sabe que la deficiencia de este metal puede afectar seriamente la funcionalidad en el cerebro, siendo los astrocitos los principales reguladores del metabolismo del cobre⁶⁰.

El papel del cobre en el desarrollo y en el tratamiento de la depresión hoy en día no está completamente comprendido, sin embargo la interacción entre el cobre y el receptor del glutamato (N-metil-D-aspartato, NMDA ó NMDAR) es de suma importancia.

Este metal está involucrado en el funcionamiento y la homeostasis de los sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos, glutamatérgicos y GABAérgicos, que están estrechamente relacionados con la depresión.

Por otro lado, el funcionamiento y el desarrollo del sistema nervioso central es fuertemente dependiente de Cu(II), por lo tanto este ión juega un papel muy importante en procesos tales como la neurotransmisión, procesos de aprendizaje y de memoria, la neurogénesis, la sinaptogénesis y el crecimiento neuronal.

Es conocido el hecho que el cobre es capaz de poder bloquear al receptor del glutamato (NMDA ó NMDAR). Así por ejemplo se indican valores de un $IC_{50} \approx 20 \mu M$ pero a dosis $> 30 mM$ el bloqueo por parte de este metal es prevaleciente⁶¹, sin embargo a concentraciones menores, por ejemplo $0,1-10 \mu M$, esos efectos no son observados⁶².

⁵⁸ D. Hernández Villén, S. López Martínez. *Rev Lab Clin.* **2011.** 4, 102-111.

⁵⁹ V. Desai, S. Kaler. *Am J Clin Nutr.* **2008.** 88, 855-858.

⁶⁰ I.F Scheiber, J.F Mercer, R. Dringen. *Prog Neurobiol.* **2014.** 116, 33-57.

⁶¹ C. Marchetti, I. Baranowska-Bosiacka, P. Gavazzo. *Brain Res.* **2014.** 1542, 20-31.

⁶² J.J Martínez Medina, L.G Naso, A.L Pérez, A. Rizzi, N.B Okulik, M. Valcarcel, C. Salado, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *Biomed Pharmacother.* **2019.** 111, 414-425.

Cuando el receptor NMDA es inhibido por este metal, esto le otorga a las neuronas protección frente a la excitotoxicidad glutamatérgica⁶³ (ya que las neuronas pueden ser dañadas y destruidas por las sobreactivaciones del neurotransmisor, glutamato (Glu), sobre el receptor NMDA). Y es sabido que anomalías de la transmisión glutamatérgica es una de las posibles causas de la depresión. Ver sección 2.4.4.1.

Por otro lado You y colaboradores⁶⁴ demostraron que el cobre, puede acomplejarse con la proteína príon, la PrPC. El complejo Cu-PrPC, puede así unirse NMDA (Figura 6) y de esta forma logra reducir alostéricamente la afinidad de la glicina, aumentando así la desensibilización.

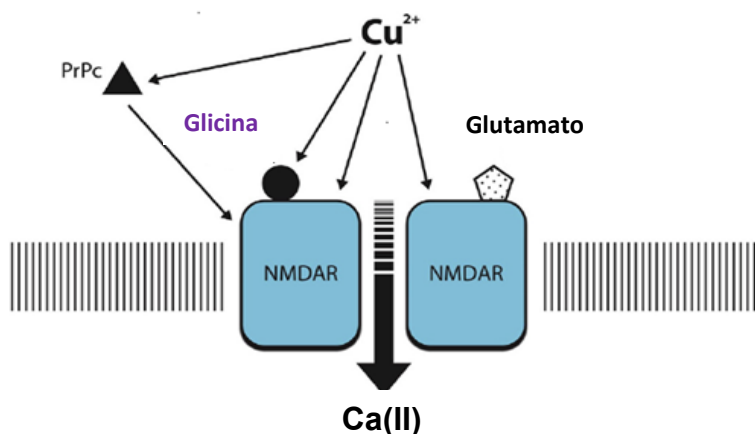


Figura 6. Cuando los iones de cobre son liberados, inhiben el funcionamiento del receptor NMDAR y AMPA. De esta manera las neuronas poseen protección frente a la excitotoxicidad glutamatérgica. Por otro lado la unión del Cu(II) induce cambios conformacionales en la proteína PrPC. Las interacciones dependientes del cobre entre PrPC y la subunidad NMDAR regulan el complejo receptor de glicina.

2.3.6. Rol del cobre en el estrés oxidativo

La deficiencia de cobre afecta el sistema de defensa antioxidante ya que se compone de enzimas dependientes de cobre.

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) disminuye, lo que incrementa el nivel de especies reactivas de oxígeno (EROs) generando daño oxidativo a los lípidos, ADN y proteínas. Como consecuencia, también se genera una disminución en la actividad de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) acumulándose una mayor cantidad de EROs lo que resulta en un incremento tanto de los niveles de Fe(II) (debido a una disminución de la actividad de ceruloplasmina) y del radical hidroxilo que como resultado ataca tanto el ADN como los lípidos, desencadenando la muerte celular.

En la Figura 7 se muestra la cadena de consecuencias debida a la disminución de los niveles de cobre.

⁶³ C. Peters, B. Munoz, F.J Sepulveda, et al. *J Neurochem.* **2011.** 119, 78-88.

⁶⁴ H. You, S. Tsutsui, S. Hameed, et al. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **2012.** 109, 1737-1742.

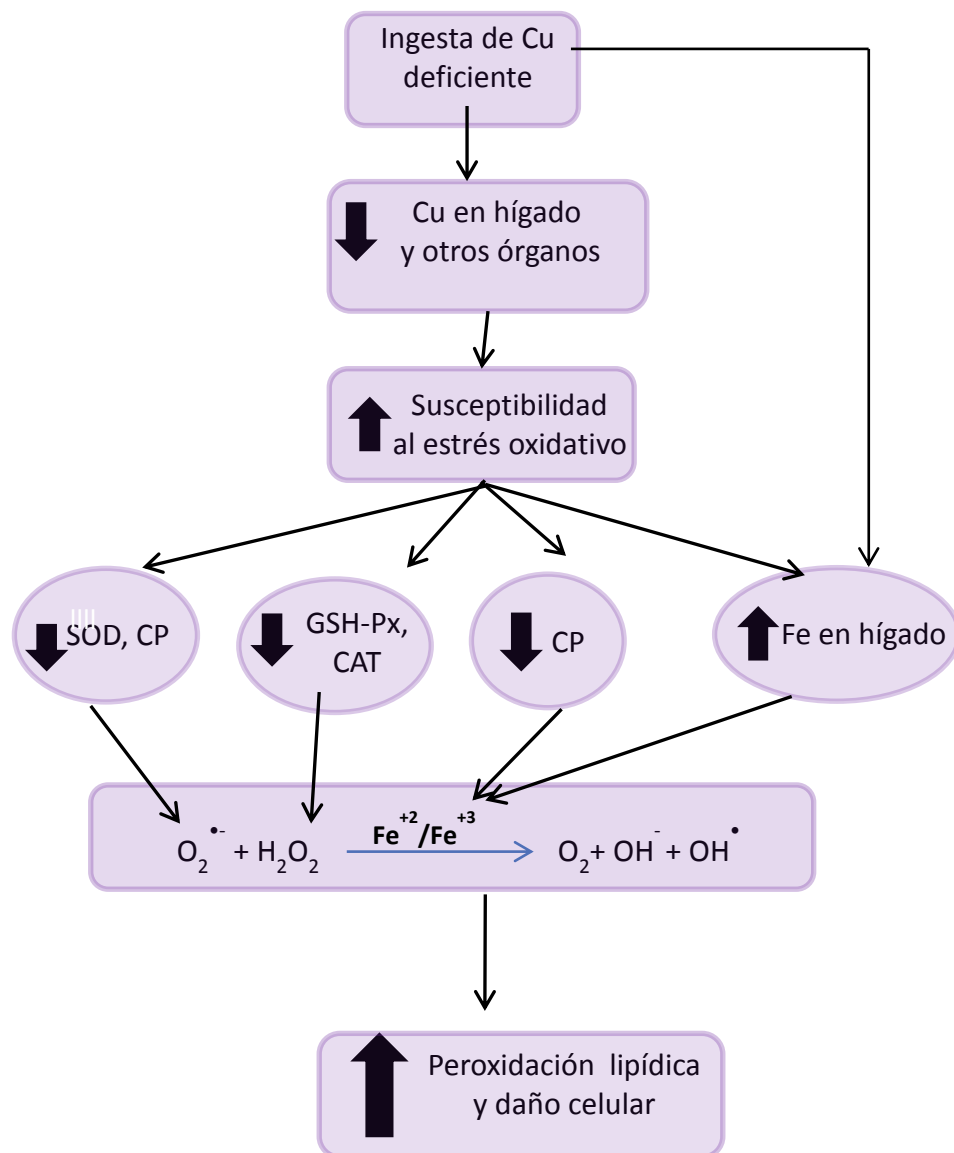


Figura 7. Modelo teórico del cobre como nutriente antioxidante. CAT, catalasa; CP, ceruloplasmina; Cu, cobre; Fe, hierro; GSH-Px, glutatión peroxidasa; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; O₂^{•-}, radical anión superóxido; OH•, radical hidroxilo; SOD, superóxido dismutasa⁶⁵.

El exceso de cobre puede traer también como consecuencia un aumento del estrés oxidativo dada la habilidad del cobre de catalizar el agua oxigenada de acuerdo a la siguiente reacción:



El aumento de la concentración del mismo entonces puede causar un aumento del daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, desencadenando enfermedades

⁶⁵ M.A Johnson, J.G Fischer, S.E Kays. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **1992.** 32, 1-31.

neurodegenerativas. Además el Cu(II) puede unirse a restos de azufre de las proteínas disminuyendo su actividad.

2.4. Magnesio

El Magnesio es el octavo elemento mayoritario en la corteza terrestre. Se encuentra principalmente en depósitos minerales, por ejemplo en la magnesita (carbonato de magnesio) y dolomita. La fuente más abundante biológicamente disponible de magnesio se encuentra principalmente en la hidrosfera (océanos y ríos). En el mar, la concentración de magnesio es aproximadamente de 55 mmol/L y en el mar muerto, la concentración reportada llega a ser de 198 mmol/L y estos valores se han ido incrementando con los años⁶⁶. El Magnesio es un electrolito esencial para los organismos vivos y es el cuarto mineral más abundante en el cuerpo humano y el segundo catión en importancia dentro de la célula y juega un papel como cofactor en más de 300 reacciones enzimáticas. Los humanos necesitan consumir este elemento regularmente para prevenir su deficiencia.

2.4.1. Aspectos biológicos del Magnesio

El cuerpo humano adulto contiene aproximadamente 24 g (1 mol) de magnesio en células a diferencia de los 280 que se hallan en los fluidos extracelulares⁶⁷. El esqueleto representa en el cuerpo el mayor reservorio de este metal (conteniendo aproximadamente el 60% del magnesio total del organismo) y esto ayuda a mantener constantes los niveles séricos del mismo.

El magnesio interviene en procesos bioquímicos primitivos como la fotosíntesis y adhesión celular, actúa como regulador de la estructura del ribosoma, en el transporte de la membrana, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; generación y transmisión del impulso nervioso, contracción muscular y cardíaca así como en la fosforilación oxidativa.

Debido a las numerosas funciones que cumple el magnesio dentro del organismo, este juega un rol importantísimo en la prevención y tratamientos de muchísimas enfermedades. Los niveles bajos de magnesio se han asociado con numerosas enfermedades crónicas como inflamatorias, entre las cuales se conocen la enfermedad de Alzheimer, asma, trastorno por déficit atencional e hiperactividad (TDAH), resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, insulina, hipertensión arterial, migrañas y osteoporosis⁶⁸.

En los sistemas biológicos, los iones magnesio existen en tres estados diferentes: unido a proteínas, complejo con aniones, y como catión (Mg^{2+}) que es la forma en la se halla con actividad biológica y este es un componente esencial para la ejecución de muchísimas funciones celulares.

⁶⁶ I. Bodaker, I. Sharon, M. Suzuki, R. Feingersch, M. Shmoish, E. Andreishcheva, M.L. Sogin, M. Rosenberg, M.E. Maguire, S. Belkin. *ISME J.* **2010.** 4, 399-407.

⁶⁷ M.J. Halpern. *Normal Physiol Biochem.* **1985.** 1-8.

⁶⁸ Y. Song, P.M. Ridker, J.E. Manson, N.R. Cook, J.E. Buring, S. Liu. *Diabetes Care.* **2005.** 28, 1438-1444.

2.4.2. Absorción y transporte de magnesio

La homeostasis del magnesio es mantenida por el intestino, el hueso y los riñones luego de ser ingerido es absorbido principalmente por el intestino delgado. Del total del magnesio consumido en la dieta entre el 24 % -76 % es absorbido y el resto es eliminado en las heces^{69,70}.

La mayor parte del magnesio se absorbe en el intestino delgado por un mecanismo paracelular pasivo, que es impulsado por un gradiente electroquímico y un arrastre de solvente. La absorción paracelular de magnesio es responsable del 80 % al 90 % de su absorción intestinal. La fuerza impulsora detrás de este transporte de magnesio pasivo es suministrada por su alta concentración luminal, que oscila entre 1,0 y 5,0 mmol/L, y el voltaje trans-epitelial de ~ 15 mV. El mecanismo exacto que facilita la absorción paracelular de magnesio sigue siendo desconocido. Se sabe que el íleon y las partes distales del yeyuno son los más permeables para los iones. Como tal, el transporte de magnesio paracelular parece restringido principalmente a estas áreas. Una fracción reguladora menor, pero importante, del magnesio se transporta a través del receptor de potencial transitorio (TRPM6 y TRPM7)⁷¹ que también desempeña un papel importante en la absorción intestinal de calcio^{70,71}.

2.4.3. Química del magnesio

El papel que juega este catión en los sistemas biológicos se comprende considerando las propiedades químicas básicas del Mg(II) que lo destacan sobre otros cationes biológicos de importancia.

El radio iónico del Mg(II) más pequeño y posee un radio de hidratación sustancialmente mayor frente a los otros cationes.

A diferencia del Ca(II) que puede presentar mayor flexibilidad respecto a los arreglos estructurales en sus enlaces de coordinación (6, 7, 8 y 9), el Mg(II) está mucho más restringido (6) generando así estructuras más rígidas en los complejos de magnesio. Una consecuencia de estos arreglos es que la velocidad de intercambio de moléculas de agua en torno a éste es mucho más lenta⁷² que para otros cationes. Es por ello que el Ca(II) nunca resulta ser atrapado en reacciones secundarias sin importancia, es más, por su elevada carga le permite poder fluir muy rápidamente por los tejidos. Todo esto permite explicar por qué las funciones bioquímicas en las que participan el Mg(II) y el Ca(II) son muy diferentes entre sí. En cambio el Mg(II) participa como cofactor esencial de muchísimas enzimas. Para estas enzimas (no dependientes de ATP) el ion magnesio puede servir para mantener una molécula de agua en una posición específica, tanto para ayudar a formar una estructura particular o para ubicar a una molécula de agua en la posición correcta que le permita

⁶⁹ J. Jahnke-Dechent, M. Ketteler. *Clin Kidney J.* **2012.** 5, 3-14.

⁷⁰ N.E Saris, E. Mervaala, H. Karppanen, J.A Khawaja, A. Lewenstam. *Clin Chim Acta.* **2000.** 294, 1-26.

⁷¹ R.M Touyz. *Front Biosci.* **2004.** 9, 1278-1293.

⁷² J.E Wedekind, G.H Reed, I. Rayment. *Biochemistry.* **1995.** 34(13), 4325-433.

poder participar directamente en el mecanismo de acción de la enzima. El hecho de que la velocidad de intercambio de agua en la capa de hidratación en el Mg(II) es lenta, hace más difícil que pueda perder agua y le permite formar estructuras con una geometría particular. Esta particularidad recién descripta para el Mg(II), es un mecanismo de reacción exhibido por pocos metales.

Otro aspecto a destacar en la bioquímica de Mg(II) es su elevada densidad de carga que se revela en que puede actuar como un ácido de Lewis. Esta propiedad en el Mg(II) se ve reflejada por la capacidad que posee para polarizar un grupo funcional tal como un carbonilo en amidas o ésteres o también para poder estabilizar la carga de un anión. Es por este motivo que puede actuar durante la catálisis enzimática y esto se observa típicamente durante la hidrólisis de ésteres de fosfato y transferencias de grupos fosforilo.

⁷³

2.4.4. Importancia de generar nuevos compuestos a partir de magnesio

Desde un punto de vista químico, el ion Mg(II) atrae moléculas de agua encontrándose solvatado. Por otra parte posee un valor de potencial iónico alto (medido por su relación carga/radio) a diferencia de los otros iones K(I), Na(I) y Ca(II), esto hace que posea un fuerte poder polarizante y es por ello que tiene tendencia para unirse a grupos con elevadas cargas negativas, de forma preferencial se une al oxígeno, principalmente a través de grupos carboxílicos, fosfatos y enolatos⁷⁴, también por los átomos de nitrógeno del grupo amina y de los residuos de imidazol. Como un ion cargado positivamente, se une a grupos cargados negativamente en la membrana celular, proteínas y ácidos nucleicos y puede cambiar una conformación local provocando un efecto de cribado eléctrico. El Mg(II) actúa como cofactor de varias reacciones enzimáticas y es particularmente relevante para aquellos que usan nucleótidos como cofactores o sustratos.

Como gran parte de este electrolito se localiza en los huesos, éste se volvió crucial para la función neurológica y muscular normal (la hipomagnesemia produce hiperexcitabilidad)^{63,75}. Estas funciones esenciales hacen que la deficiencia de magnesio sea una condición médica grave. De hecho, se hizo relevante en la década de 1950 cuando se describieron las consecuencias de su insuficiencia para varias afecciones patológicas en los seres humanos y se empezaron a prescribir diferentes compuestos de magnesio como suplemento.

Hay muchas formulaciones de magnesio y se prefieren los derivados de los aminoácidos naturales (aspártico, glutámico, acético, ascórbico, cítrico, glucónico, láctico, málico, ácido orótico, así como ácido piroglutámico (pidólico), entre otros). En la literatura se describe su uso para (i) profilaxis⁷⁶, (ii) restauración del equilibrio de electrolitos en transpiración/transpiración

⁷³ J.A Cowan. *BioMetals*. **2002**. 15, 225-235.

⁷⁴ F.I Wolf, A Cittadini. *Mol Aspects Med*. **2003**. 24, 3-9.

⁷⁵ J. Vormann. *Mol Aspects Med*. **2003**. 24, 27-37.

⁷⁶ P.B Sheth, F.J Dechow. **1990**. *Oral Magenesium and Potasium compositions and use*. US N°4954349.

excesiva⁷⁷, (iii) mejora de la nutrición, funciones cognitivas, de aprendizaje o de memoria⁷⁸, (iv) enfermedad de Alzheimer, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, enfermedad de Parkinson, diabetes, migraña, ansiedad, trastorno, trastorno del estado de ánimo e hipertensión⁷⁹, (v) dolor y dolor asociado con neuropatía⁸⁰, (vi) estimulación de la renovación epidérmica⁸¹.

Además, en relación con este trabajo, el ácido piroglutámico y sus derivados metálicos (pidolatos) se han utilizado durante mucho tiempo como medicamentos de suplementación (magnesio⁸² y compuestos de calcio⁸³ y cosméticos (sodio)).

2.4.5. Rol del Magnesio en la depresión

Varios estudios han puesto de manifiesto que una ingesta inadecuada de magnesio puede conducir a diferentes problemas de salud como la hipertensión⁸⁴, enfermedades cardiovasculares⁸⁵, diabetes tipo 2^{78,86} y enfermedades neurológicas como la migraña, la epilepsia y la depresión⁸⁷.

El modo de acción del efecto antidepresivo del magnesio aún no está totalmente esclarecido⁸⁸. Pero existe evidencia muy fuerte de que el magnesio influye positivamente en varios de los sistemas que están asociados con el desarrollo de la depresión. Actualmente se sabe que este catión regula la actividad de los receptores NMDA y GABA, que son los que juegan un papel importantísimo en suprimir el inicio de la actividad en el hipocampo, de tal forma que disminuye la liberación de la hormona adrenocorticotrófica⁸⁹ (ACTH) que interactúa con el eje límbico-hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), y este se encuentra frecuentemente desregulado en personas con síntomas depresivos. Además, probablemente afecta el acceso de corticoides al cerebro a través de la influencia sobre la glicoproteína P, que participa en la inactivación de la

⁷⁷ F.A Bibiano, D.M Abano terme, J.C.S Selvazzano. **2006**. *Composition for the relief of heat stress*. US N⁰007001612B2.

⁷⁸ G. Liu, F. Mao. *Magnesium compositions and use thereof*. US N⁰0248100A1. **2008**.

⁷⁹ G. Liu, B.K Meister, H. Zhou, F. Mao. *Magnesium compositions and use thereof*. WO N⁰116226A2. **2008**.

⁸⁰ C.U Singh. *Novel pharmaceutical compositions for treating chronic pain and pain associated with neuropathy*. US N⁰ 0189354A1. **2013**.

⁸¹ J.B Galey. *Metal complexes for promoting skin desquamation and/or stimulating epidermal renewal*. US N⁰ 0224028A1. **2003**.

⁸² J-P Couzinier, H. Cousse. 3, 198. *Composition pharmaceutique effervescente à base de magnesium*. FR-OS 2546064. **1984**.

⁸³ H-P Krimmer, K. Drauz, S Werner. *Methods of preparing alkaline earth metal salts of 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid*. US N⁰4921971. **1990**.

⁸⁴ Y.Q Song, H.D Sesso, J.E Manson, N.R Cook, J.E Buring, S.M Liu. *Am J Cardiol*. **2006**. 98, 1616-1621.

⁸⁵ Y.Q Song, J.E Manson, N.R Cook, C.M Albert, J.E Buring, S.M Liu. *Am J Cardiol*. **2005**. 96, 1135-1141.

⁸⁶ Y.Q Song, J.E Manson, J.E Buring, S.M Liu. *Diabetes Care*. **2004**. 27, 59-65.

⁸⁷ F.N Jacka, S. Overland, R. Stewart, G.S Tell, I. Bjelland, A. Mykletun. *Austr NZ J Psychiatry* **2009**. 43, 45-52.

⁸⁸ C.C Cardoso, K.R Lobato, R.W Binfare, P.K Ferreira, A.O Rosa, A.R Santos, A.L Rodrigues. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2009**. 33, 235-242.

⁸⁹ H. Murck. *Nutr Neurosci*. **2002**. 5, 375-389.

neurotransmisión de la proteína quinasa C y estimula la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa.

Se ha sugerido que la alteración de la homeostasis del magnesio se asocia con trastornos afectivos y depresión en particular. Es por ello que el factor nutricional es un componente clave que contribuye en el desarrollo de la enfermedad y por lo tanto los cambios en los hábitos alimenticios constituyen una posibilidad interesante en la prevención de la depresión. Jacka y colaboradores⁹⁰ reportaron que personas depresivas consumían una dieta empobrecida en este metal.

Estudios en animales han demostrado que en dietas deficitarias el magnesio incrementa el comportamiento de ansiedad y de depresión en ratones⁹¹, y que el consumo de este metal revierte los síntomas. En ensayos preclínicos de tratamientos donde se suministra cloruro de magnesio en animales, se ha observado que este último posee un efecto farmacológico como antidepresivo, y esto podría potenciar la efectividad de los compuestos antidepresivos en terapias de depresión en humanos⁹². De forma similar también se han reportado mejoras en el tratamiento de depresión postraumática y ansiedad en ratas utilizando sulfato de magnesio⁹³.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que existen diferencias importantes entre los modelos experimentales de depresión en ratones y ratas con la depresión humana. En relación a esto último, se han reportado varios estudios donde queda en evidencia que el magnesio puede ser útil en el tratamiento de depresión⁹⁴.

2.4.5.1. Magnesio y el receptor NMDA (N-metil-D-aspartato)

El magnesio, Mg(II) , en condiciones normales, es un antagonista endógeno de calcio en el receptor de NMDA (N-metil-D-aspartato), éste es esencial para la transmisión sináptica excitatoria, la plasticidad neuronal y la excitotoxicidad, por lo tanto, juegan un papel importante en la plasticidad del desarrollo, el aprendizaje y la memoria⁹⁵.

El receptor NMDA ha recibido mayor atención debido a su papel en la fisiopatología y la respuesta al tratamiento en la depresión. Es uno de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos más abundantes que hay en el cerebro de los mamíferos. Las concentraciones neuronales de Mg(II) son de gran importancia en la regulación de la excitabilidad del mismo.

⁹⁰ F.N Jacka, S. Overland, R. Stewart, G.S Tell, I. Bjelland, A. Mykletun. *Aust N Z J Psychiatry*. **2009**. 43, 45-52.

⁹¹ N. Singewald, C. Sinner, A. Hetzenauer, S.B Sartori, H. Murck. *Neuropharmacology*. **2004**. 47, 1189-1197.

⁹² C.C Cardoso, K.R Lobato, R.W Binfare, P.K Ferreira, A.O Rosa, A.R Santos, et al. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2009**. 33, 235-242.

⁹³ L. Fromm, D.L Heath, R. Vink, A.J Nimmo. *J Am Coll Nutr*. **2004**. 23, 529-533.

⁹⁴ G.A Eby, K.L Eby. *Med Hypotheses*. **2006**. 67, 362-370.

⁹⁵ P. Paoletti, C. Bellone, Q. Zhou. *Nat Rev Neurosci*. **2013**. 14, 383-400.

El receptor NMDA consta de cuatro subunidades, cada una con diferentes propiedades bioquímicas. Este receptor tiene bloqueado el canal de flujo de Ca(II) por la unión del Mg(II) , y solamente puede ser activado cuando se unen a él de forma simultánea el glutamato y la glicina (co-agonistas), así puede mediar la entrada de iones de Ca(II) y Na(I) y el flujo de salida de iones de K(I) .

El glutamato es liberado desde la neurona presináptica, se une a los receptores AMPA (Ácido (3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-il) propanoico) y NMDA de la neurona postsináptica. En ese momento el potencial normal de la membrana es de -70 mV y el ión Mg(II) está bloqueando al receptor NMDA. Por lo tanto el flujo de cationes es facilitado por los receptores AMPA. Cuando el valor de potencial de membrana supera el valor de -60 mV ⁹⁶ (Figura 8), se alivia el bloqueo por parte del Mg(II) se reduce la afinidad del sitio de unión por el Mg(II) y se abren los receptores de NMDA tras la unión de glutamato. Este aumento del potencial postsináptico excitatorio provoca hiperexcitabilidad de las neuronas y la transmisión del impulso nervioso es continuada. En el cerebro adulto, este proceso se amplifica aún más por la acción de los receptores inhibitorios del ácido aminobutírico (GABA), cuya función también está regulada por Mg(II) .

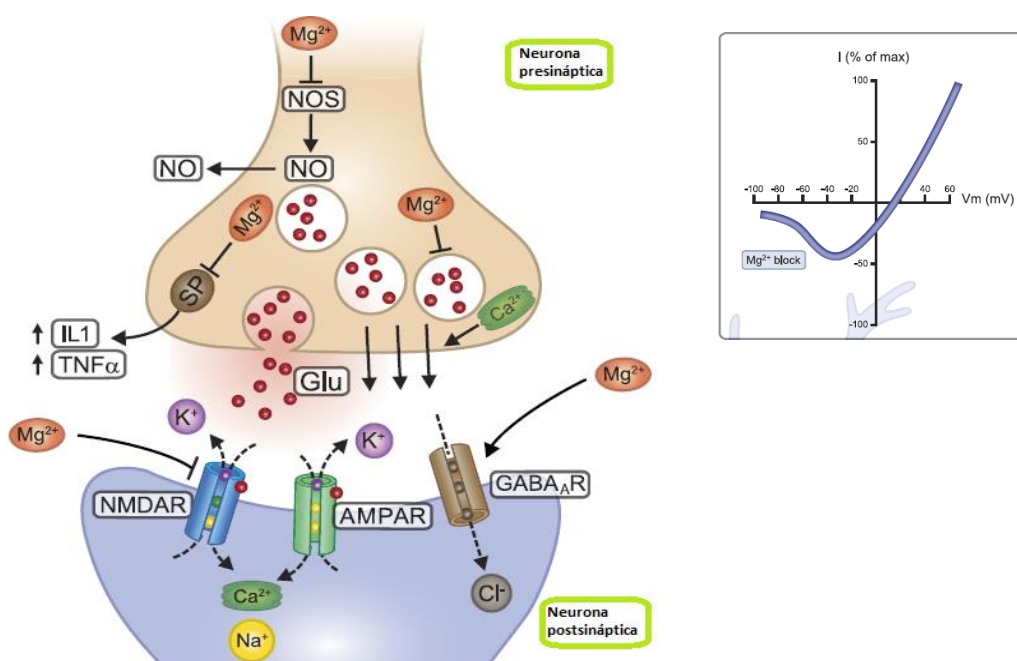


Figura 8. Representación esquemática de la estructura del receptor NMDA⁹⁵. Permeabilidad y bloqueo del canal de Ca(II) por Mg(II) .

La muerte neuronal inducida por una excesiva liberación de glutamato y la sobreactivación de los receptores de NMDA, se conoce como excitotoxicidad. Este fenómeno se asocia con diversos procesos implicados en la neurodegeneración y muerte celular. La sobreactivación produce una elevación de la concentración de Ca(II) intracelular que promueve la lipoperoxidación (LP) de la membrana citoplasmática, retículo endoplasmático (RE) y la

⁹⁶ J.H.Fde Baaij, J.G.J Hoenderop, R.J.M Bindels. *Physiol Rev.* **2015.** 95, 1-46.

mitocondria⁹⁷. Esta lipoperoxidación se debe a la producción de óxido nítrico (NO) y radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los cuales forman peroxinitritos que altera la actividad de los transportadores de la membrana y canales iónicos cuando los lípidos de las membranas son peroxidados⁹⁸. También la LP induce daño a la bomba Na^+/K^+ ATPasa, a los transportadores de glucosa y de Glu como parte del proceso excitotóxico, perturba la homeostasis iónica en el RE y mitocondria, comprometiendo el abastecimiento de ATP (Figura 9). El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} desencadena la activación de vías de señalización intracelular relacionadas con la muerte celular apoptótica como son: la activación de diferentes enzimas dependientes de Ca^{2+} (proteasas, nucleasas y fosfolipasas)⁹⁶.

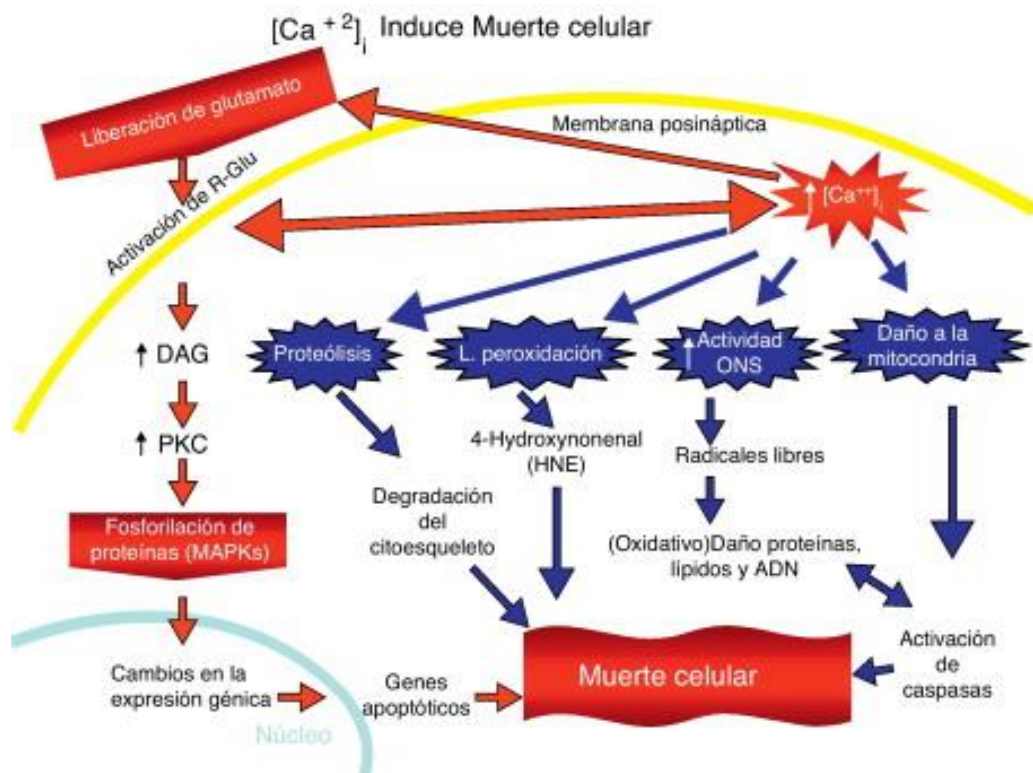


Figura 9. Muerte celular excitotóxica⁹⁹.

Al regular la entrada intracelular de Ca^{2+} , el magnesio puede adquirir propiedades neuroprotectoras y probablemente así otorga protección contra la muerte celular a las neuronas^{100,101}. La deficiencia de magnesio puede destruir a las neuronas porque causa la apertura de los canales de calcio acoplados al receptor NMDA, generando un aumento en la concentración de calcio neuronal.

⁹⁷ M.P Mattson, F.M LaFerla, S.L Chan, M.A Leissring, P.N Shepel. *J D Trends Neurosci.* **2000.** 23, 222-229.

⁹⁸ M.P Mattson, C. Culmsee. *Z F Cell Tissue Res.* **2000.** 301, 173-187.

⁹⁹ M.E Flores-Soto, V. Chaparro-Huerta, M. Escoto-Delgadillo, E. Vazquez Valls, R.E González-Castañeda, C. Beas-Zarate. *Neurology.* **2012.** 27(5), 301-310.

¹⁰⁰ T. Gillessen, S. Budd, S. Lipton. *New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers.* **2002.** 513, 3-40.

¹⁰¹ A.I Sobolevskii, B.I Khodorov. *Neurosci Behav Physiol.* **2002.** 32, 157-171.

Es importante destacar que el glutamato al ser el principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro, es dañino cuando está en exceso. Entonces cuando los niveles de calcio y de glutamato están elevados, pero con un entorno deficiente de magnesio puede llevar a generar mal funcionamiento en la sinapsis neural, en particular en la zona del hipocampo llevando a desarrollar depresión como otras enfermedades psiquiátricas¹⁰².

2.5. Relevancia biológica de los ligandos seleccionados.

Las sustancias con acción antitiroidea que más se utilizan en la práctica clínica son los fármacos derivados de la tiourea, conocidos como agentes antitiroideos de síntesis. Poseen un grupo azufre ionizable que unido al esqueleto ureico forma el grupo tioamida, esencial para la acción antitiroidea.

La tiourea es la estructura más simple de la familia de los compuestos que tienen un grupo tioamida. La tioamida es un grupo funcional con la estructura general $R_1-CS-NR_2R_3$, donde R_1 , R_2 y R_3 son grupos orgánicos (Figura 10). Son análogos a las amidas, pero exhiben mayor carácter de enlace múltiple en el enlace C-N, resultando en una barrera rotacional mayor.

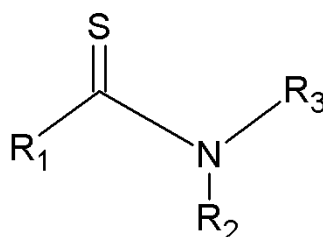


Figura 10. Estructura general de una tioamida.

La tiourea heterocíclica con anillos de cinco miembros, tienen seis electrones π en un ciclo de $(2\pi + p)$ orbitales que exhiben una deslocalización similar a la que presentan los orbitales de una molécula cíclica, con anillo plano.

Las tioureas, al contener un átomo de azufre dador en su estructura, coordinan preferentemente con los metales de transición y los metales pesados. Se ha comprobado experimentalmente que los ligandos orgánicos con el grupo funcional C=S se caracterizan por una alta densidad electrónica sobre el átomo de azufre. En las tioureas este hecho se ve incrementado debido al efecto de resonancia tioamidica. Una cuestión, muy discutida sobre el comportamiento químico de las tioureas, es la posibilidad de coordinación simultánea con el átomo de nitrógeno. En este sentido, los criterios han sido contradictorios y no aparecen descritas estructuras de complejos con esas características por difracción de rayos X.

¹⁰² M.L Derom, C. Sayon-Orea, J.M Martinez-Ortega, M.A Martinez-Gonzalez. *Nutr Neurosci.* **2013.** 16, 191-20.

En los complejos metálicos mononucleares, las tioureas han mostrado una gran efectividad como ligandos a través de la coordinación por el átomo de azufre. Sin embargo, en las reacciones que involucran complejos metálicos polinucleares la coordinación por el átomo de azufre es generalmente acompañada de un reordenamiento y ruptura de enlaces para formar los conocidos cúmulos^{103,104}.

Derivan de la tiourea el propiltiouracilo (6-propil-2-tiouracilo), el metimidazol (1-metil-2-mercaptoimidazol) y carbimazol, derivado carboetoxi de metimidazol (3-etoxicarbonil-1-metil-2,3-dihidro-1Himidazol-2-tiona) que en el organismo se convierte en metimidazol. Sus capacidades antitiroideas se relacionan con su capacidad de actuar como dadores de electrones.

Metimidazol

El metimidazol es un compuesto heterocíclico aromático que consiste en un anillo plano de cinco miembros con dos átomos de nitrógeno y un átomo de azufre (Figura 11). Su aromaticidad se debe al hecho que contiene un sistema π -electrónico derivado de los cinco orbitales p que contienen seis electrones.

Químicamente los dos nitrógenos se consideran diferentes. Así el nitrógeno en posición 1 es tipo azo, ya que aporta un par de electrones no enlazante al anillo aromático y forma un enlace N-H con un protón relativamente ácido. Sin embargo, el otro nitrógeno, es de tipo azina contiene el par de electrones fuera del sistema aromático.

Presenta un carácter polifuncional, con S y N en su anillo heterocíclico con dos sitios probables de coordinación como consecuencia de la presencia de tautomerismo en la molécula¹⁰⁵.

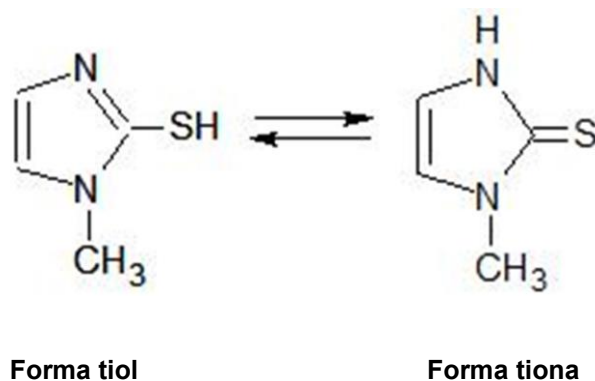


Figura 11. Metimidazol: Formas tautoméricas.

¹⁰³ E. Boroni, G. Predieri, A. Tiripicchio. *J Organomet Chem.* **1993.** 451,163-175.

¹⁰⁴ U. Bodensiek, L. Hoferkamp, H. Stoeckli-Evans. *J Chem Soc Dalton Trans.* **1993.** 1, 127-134.

¹⁰⁵ F.L. Soares, M.R. Silva, C.A. Doriguetto, J. Ellena, Y.P. Mascarenhas, E. Castellano. *J Brazilian Chem Soc.* **2004.** 15, 205-209.

El metimidazol es la droga antitiroidea comúnmente usada para la enfermedad hipertiroides, Enfermedad de Grave's, la cual causa tirotoxicosis. Este padecimiento va acompañado de un número de síntomas directamente relacionados con el exceso de hormonas tiroideas¹⁰⁶. A pesar de que se utilizan desde hace más de cuarenta años, su mecanismo de acción no se encuentra completamente elucidado. Se conoce que inhibe las síntesis de hormonas tiroideas pero no la liberación de las ya preformadas. Actúan como inhibidores de la organificación del yodo, así como de su unión a la tirosina de la tiroglobulina. También impiden el acoplamiento de las monoiidotirosinas (MIT) y de las diidotirosinas (DIT) para formar triidotirosina (T3) y tetraidotirosina (T4) y provocan interacciones directas con la molécula de tiroglobulina¹⁰⁷.

Clorhidrato de sertralina (sertralina)

La sertralina es un antidepresivo de administración oral y es un potente y selectivo inhibidor del mecanismo de recaptación de serotonina en la terminal presináptica, con lo que se potencia el efecto de este neurotransmisor. Su efecto es muy leve sobre la recaptación neuronal de noradrenalina y dopamina^{108,109}.

Desde el punto de vista farmacocinético, la sertralina se absorbe lentamente después de su administración por vía oral, con un pico de su concentración en plasma a las 6-8 h. Su concentración en plasma se relaciona linealmente con la dosis, con una vida media de eliminación de 24-26 h. Además, se une extensamente a las proteínas del plasma y tiene un elevado volumen de distribución^{110,111}.

Asimismo, la acumulación más rápida de sertralina en los niveles plasmáticos en el estado estable (aproximadamente una semana de la administración diaria en comparación con fluoxetina, por ejemplo), sugiere un inicio del efecto antidepresivo más rápido concordante con la acción terapéutica¹¹².

En relación al metabolismo, la sertralina sufre un extenso proceso metabólico en su primer paso hepático, cuyo metabolito principal es la N-desmetil-sertralina, la cual tiene una vida media en plasma aproximadamente de 62 a 104 h⁸². Este metabolito parece carecer de propiedades de inhibir la recaptación de serotonina en estudios *in vitro* e *in vivo*¹¹³.

La sertralina ha demostrado efectos antidepresivos en estudios preclínicos y en estudios clínicos ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la depresión mayor y desórdenes de ansiedad, como la ansiedad social, estrés post-

¹⁰⁶ C. Tener, A. Zárate, L. Basurto, S. Islas, C. Revilla, R. Ochoa, R. Galván, P. Santos. *Rev Inv Clin.* **2001.** 53, 531-535.

¹⁰⁷ D.S Cooper. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **1998.** 27, 225-247.

¹⁰⁸ A.F Schatzberg. *J Clin Psychiatry.* **2003.** 64, 30-37.

¹⁰⁹ M. Mucci. *J Psychopharmacol.* **1997.** 11, 33-37.

¹¹⁰ S.K Guthrie. *DICP.* **1991.** 25, 952-956.

¹¹¹ S.J Warrington. *Int Clin Psychopharmacol.* **1991.** 2, 11-21.

¹¹² P.J Goodnick, B.J Goldstein. *J Psychopharmacol.* **1998.** 1, 20-25.

¹¹³ J. Sprouse, T. Clarke, L Reynolds. *Neuropsychopharmacology.* **1996.** 14, 225-231.

traumático, pánico, trastorno obsesivo compulsivo y desorden de ansiedad generalizada^{114,115}.

En relación a sus efectos adversos, los más frecuentes incluyen alteraciones gastrointestinales, como por ejemplo, náusea, dispepsia, diarrea y otras, como dolor de cabeza, temblor, sequedad de boca, mareos y somnolencia o insomnio⁸⁶. Además, se la ha descrito para tratar la disfunción sexual¹¹⁶.

Descripción química

Sertralina (Figura 12) es un enantiómero S-*cis* de un tetrahidronaftaleno disustituido. La fórmula estructural de la sertralina se da a continuación:

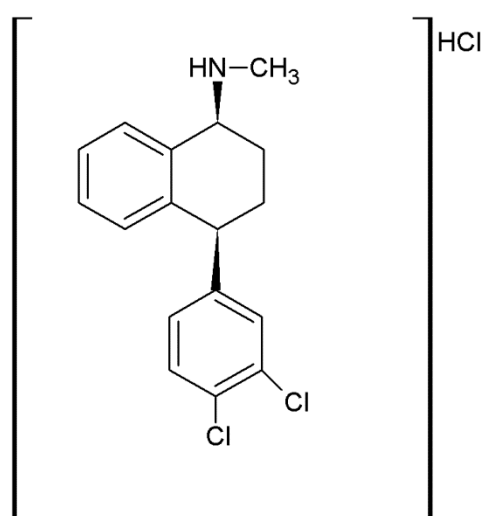


Figura 12. Sertralina (Clorhidrato de sertralonio).

Datos de Fórmula Molecular y Peso Molecular en Tabla 2.

Tabla 2. Fórmula Molecular y Peso Molecular

	Fórmula molecular	Peso molecular
Sertralina	C ₁₇ H ₁₇ NCl ₂	306,2
Clorhidrato de sertralonio	C ₁₇ H ₁₈ NCl ₃	342,7

Nombre sistemático (IUPAC): hidrocloruro de (1S,4S)-4-(3,4-Diclorofenil)-N-metil-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftalenamina (1:1)

Nombre químico: Clorhidrato de sertralonio, hidrocloruro de sertralina

¹¹⁴ D.V Sheehan, K. Kamijima. *Int Clin Psychopharmacol.* **2009.** 24, 43-60.

¹¹⁵ G. MacQueen, L. Born, M. Steiner. *CNS Drug Rev.* **2001.** 71-24.

¹¹⁶ R.M Lane. *J Psychopharmacol.* **1997.** 11, 72-82.

Ácido piroglutámico

El ácido carboxílico L-Pirrolidona, es conocido como ácido L-piroglutámico.

Este compuesto es el resultado de la reacción de condensación intramolecular del ácido L-glutámico, y ha sido identificado en las células como un intermediario generado enzimáticamente durante la biosíntesis de aminoácidos y también durante la síntesis de proteínas donde se convierte en el residuo amino terminal de péptidos de importancia biológica como de proteínas y en el transporte de aminoácido a través de la membrana celular^{117,118}. En este trabajo de tesis doctoral se utilizó su forma DL-. De igual manera que la forma L, el ácido DL-piroglutámico tiene tres sitios potenciales de coordinación: grupos COOH, NH y C=O (Figura 13).

La presencia de un enlace amida interno formado entre el nitrógeno 1 y el carbono 5 produce propiedades únicas para este amino ácido. El enlace interno es neutro y funcionalmente actúa como una amida. El par electrónico libre del nitrógeno se encuentra en resonancia y es atraído hacia el carbono 5 por la presencia del doble enlace del oxígeno (Figura 13).

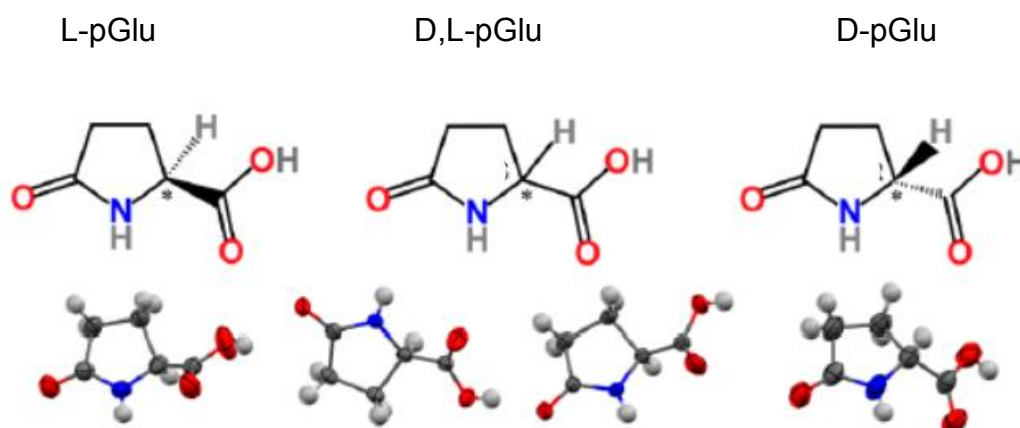


Figura 13. Ácido piroglutámico (pGlu). Estructuras de L-, D,L- (forma racémica) y D-ácido piroglutámico. Tomado de la Ref¹¹⁹

Los L-piroglutamatos metálicos, bien conocidos actualmente como pidolatos, son importantes productos de interés industrial, usados para la formulación de drogas, cosméticos^{120,121}, y su principal modo de administración como medicamento es como suplemento dietario cuando hay deficiencias de metales

¹¹⁷ H.P Krimmer, K. Drauz, H. Klenk. *Chem Ztg.* **1990.** 114, 117.

¹¹⁸ G.N Abraham, D.N Podell. *Mol Cell Biochem.* **1981.** 38, 181-190.

¹¹⁹ M.K Panda, T. Runceviski, A. Husain, R.E Dinnebier, P. Naumov. *J Am Chem Soc.* **2015.** 137, 1895-1902.

¹²⁰ G. Krohne-Ehrich, R. Untucht-Grau. *Biol Unserer Zeit.* **1976.** 6, 175-182.

¹²¹ O. Kumberger, J. Riede; H. Schmidbaur. *New J Chem.* **1993.** 17, 257-262.

alcalinos y alcalinos térreos. Desde el año 1984 este compuesto ha llamado la atención de los neurólogos por su capacidad para prevenir el Alzheimer¹²².

N,N Dimetilacetamida (DMA)

La N, N-Dimetilacetamida (Figura 14) es uno de esos disolventes no acuosos que se usa ampliamente para productos farmacéuticos y compuestos químicos industriales. DMA es útil para disolver poliacrilonitrilo, polivinilo, cloruro, poliamidas, poliimidas, derivados de celulosa, estirenos y poliésteres lineales, y también ha sido empleado en productos farmacéuticos de formulaciones tales como tetraciclina, oxitetraciclina y cloranfenicol como así como medicamentos contra el cáncer que incluyen amsacrina, diaziquona, triazina, myleran y teniposido para administración parenteral¹²³.

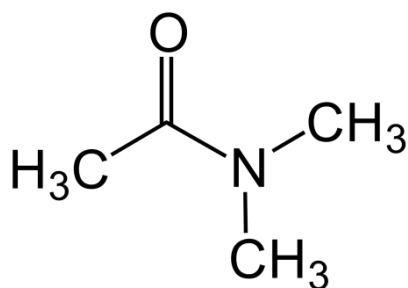


Figura 14. N,N-Dimetilacetamida.

La DMA es miscible con agua, ésteres, cetonas y compuestos aromáticos. Su naturaleza polar le permite actuar como un disolvente combinado y un catalizador de reacción que a menudo produce mayores rendimientos y un producto más puro en un tiempo más corto. Se hidroliza muy lentamente.

Su toxicidad es baja, en ser humano se informa toxicidad gastrointestinal, toxicidad hepática, hipotensión y estados de excitación mental en pacientes que recibieron DMA como agente terapéutico único a dosis diarias de 400 mg/kg durante 4-5 días siendo estos efectos reversibles al cese de los tratamientos.

¹²² S. Grioli, C. Lomeo; M.C Quattropani, G. Spignoli, C. Villardita. *Fundam Clin Pharmacol.* **1990.** 169-173.

¹²³ S-N Kim. *Drug Metabol Rev.* **1988.** 19, 345-368.

2.6. Razones para formar complejos de coordinación de Cu(II) y Mg(II) con ligandos de interés

La formación de complejos de coordinación es una estrategia útil en el diseño de fármacos permitiendo modificar ciertas características de los ligandos libres. Por este motivo, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se propone realizar complejos de coordinación con cobre(II) apoyándonos en la idea de que los complejos de coordinación pueden mejorar e incluso otorgar nuevas propiedades farmacológicas superiores que las del ligando aislado, mediante una modificación favorable de su estructura o por los cambios en la biodisponibilidad y brindando así un enorme potencial terapéutico.

Esta suposición se basa en la hipótesis de que los complejos de coordinación muestran en la literatura múltiples efectos farmacológicos. Como ya se mencionó, los complejos de coordinación con cobre son ampliamente reconocidos por sus aplicaciones farmacológicas (antioxidantes, antimicrobiana, anticancerígenas, antidiabéticas, etc).

Por ejemplo, para el primer compuesto preparado hicimos las siguientes consideraciones. Tuvimos en cuenta la conocida actividad antidepresiva de la sertralina y la información de que los niveles de cobre se reducen en pacientes con depresión. En este caso, planteamos una posible acción dual del nuevo compuesto. La idea consistía en mejorar la acción de la sertralina y, al mismo tiempo, evitar la disminución de los niveles de cobre. Por otro lado, existe una relación entre los fármacos que tienen grupos NH disponibles (como sertralina) y la actividad antitiroidea. De hecho, se ha demostrado la actividad antitiroidea *in vitro* de los antidepresivos tricíclicos. Por eso también probamos la capacidad de los complejos de cobre para formar complejos de transferencia de carga con iodo como potenciales agentes antitiroideos. Además de eso, la capacidad de imitar la actividad de la enzima peroxidasa podría estar asociada a un mecanismo de acción antitiroidea que consiste en una inhibición no directa de la enzima lactoperoxidasa (LPO) sino en una reducción del sustrato (H_2O_2) evitando así la oxidación del centro de hierro de la LPO.

También consideramos la conexión entre el hipertiroidismo y el estado depresivo. Se reconoce la tendencia de los pacientes con trastornos de tiroides a desarrollar síntomas depresivos y, en oposición, la depresión puede estar acompañada de anomalías tiroideas. Por esa razón, pensamos en la posibilidad de que el complejo actúe con un doble efecto como agente antidepresivo y antitiroideo.

También existe un vínculo entre el trastorno depresivo, la enfermedad de hipertiroidismo y el aumento del estado de estrés oxidativo. Esta conexión nos motivó a determinar también la potencialidad antioxidante del complejo.

Finalmente, algunos antidepresivos (incluida la sertralina) y también el cobre muestran actividad antimicrobiana. Por eso, también probamos si el nuevo compuesto pudo presentar y/o mejorar esta propiedad farmacológica.

Por otra parte resulta muy interesante enfocar el desarrollo de nuevos compuestos de interés farmacológico a base de magnesio, ya que por muchas décadas este metal¹²⁴ ha tenido un lugar esencial en la homeopatía como un remedio para tratar una variedad de trastornos psiquiátricos incluyendo a la depresión. Además de su administración en la práctica médica, éste ha resultado ser un agente efectivo en el tratamiento de diversos males como la migraña, el alcoholismo, el asma, enfermedades del corazón, arritmias, cálculos renal de calcio, síndrome premenstrual y muchos otros^{125,126,127,128,129}.

También es destacable el rol de las preparaciones de magnesio en el manejo de una gama de trastornos mentales, así como problemas emocionales¹²³. Al mismo tiempo, tanto los informes de los resultados clínicos como los preclínicos son muy prometedores porque apoyan el potencial terapéutico de diversas composiciones de magnesio en diferentes tipos de depresión.

En el esquema de la Figura 15, se resume brevemente la propuesta de Tesis.

¹²⁴ G.A Eby, K.L Eby. *Med Hypotheses*. **2006**. 67, 362-370.

¹²⁵ B.M Altura, B.T Altura. *Alcohol Clin Exp Res*. **1994**. 18, 1057-1068.

¹²⁶ P.R Devi, L. Kumar, S.C Singhi, R. Prasad, M Singh. *Indian Pediatr*. **1997**. 34, 389-397.

¹²⁷ J. Durlach, V. Durlach, P. Bac, M. Bara, A. Guet-Bara. *Magnes Res*. **1994**. 7, 313-328.

¹²⁸ M.A Frakes, L.E Richardson. *Am J Emerg Med*. **1997**. 15, 182-187.

¹²⁹ M. Labeeuw, N. Pozet, P. Zech, J. Traeger. *Presse Med*. **1987**. 16, 25-27.

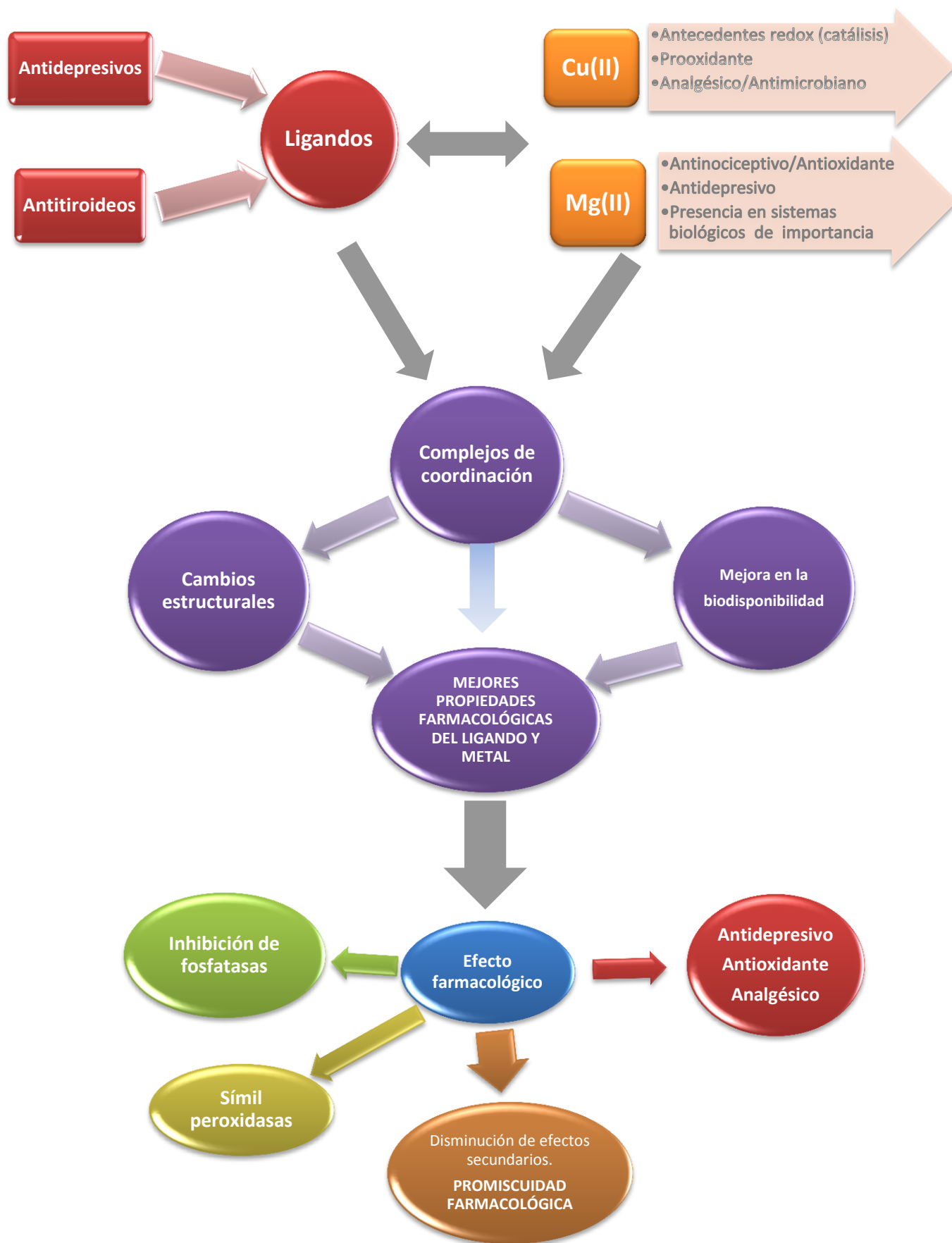


Figura 15. Resumen esquematizado de la idea general para el desarrollo de la tesis.

CAPÍTULO 3

Preparación y caracterización
fisicoquímica de los compuestos
estudiados.

Capítulo 3. Preparación y caracterización fisicoquímica de los compuestos estudiados

3.1. Síntesis de los compuestos, análisis elementales y estudios termogravimétricos

3.1.1. Síntesis de los compuestos derivados de cobre y clorhidrato de sertralonio (SerH₂Cl, sertralina): (SerH₂)₂[CuCl₄].1/2H₂O y (SerH₂)₂[CuCl₄]

Para la síntesis de los derivados de clorhidrato de sertralonio, se prepara una solución conteniendo 1 mmol de sertralina en una mezcla de solventes conteniendo 50 mL acetato de etilo y 25 mL de etanol 96% la cual se calienta a ebullición mediante agitación continua hasta completa disolución del soluto. A continuación, se prepara una solución de 0,5 mmoles de CuCl₂.2H₂O a la que se le añade 1 mL de HCl 37% con la finalidad de obtener la especie tetraclorocuprato(II) ([CuCl₄]²⁻). La solución resultante conteniendo cobre se añade entonces gota a gota sobre la primera (solución de sertralina).

Posteriormente mediante calentamiento de la misma durante 30 minutos, se reduce su volumen a la mitad. Finalmente, para favorecer la obtención de cristales, se separa en dos alícuotas dejando una alícuota a temperatura ambiente (25 °C) y la otra se conserva durante una semana en heladera (5 °C).

Los cristales obtenidos a las dos temperaturas son filtrados y lavados con etanol 96 %, para su posterior caracterización fisicoquímica.

3.1.1.1. Análisis elementales

El análisis elemental de los cristales obtenidos arrojaron los siguientes datos: forma hidratada (SerH₂)₂[CuCl₄].1/2H₂O: (C₃₄H₃₇Cl₈CuN₂O_{0,5}), el cálculo porcentual teórico obtenido fue 49,2%C, 3,4%N, 4,5%H, y el encontrado experimentalmente 49,4%C, 3,6% N, 4,6%H.

Para la forma no hidratada (SerH₂)₂[CuCl₄] el calculado corresponde a 49,7%C, 3,4%N, 4,4%H, y el encontrado experimentalmente a 50,0%C, 3,6% N, 4,3%H. En ambos casos existe una muy buena correlación entre los datos calculados con el resultado de los cálculos teóricos para las estructuras resueltas de ambos compuestos.

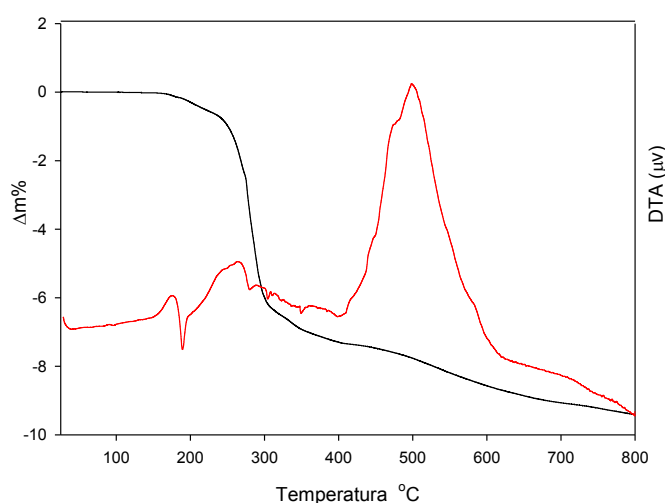
3.1.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)

Los estudios termogravimétricos se realizaron en atmósfera de oxígeno (50 mL/min). Para el compuesto hidratado, (SerH₂)₂[CuCl₄].1/2H₂O, la pérdida de agua se produce a temperaturas relativamente altas (pico endotérmico, 189°C) (Figura 1A) y la liberación del agua va acompañada por un porcentaje de

pérdida de masa del 1,2% en concordancia con el 1,1% calculado a partir de la fórmula del compuesto. Luego de la deshidratación, el compuesto se degrada en una serie de dos pasos consecutivos observados a temperaturas mayores de 200°C. La constancia del peso se alcanza a 750°C y la masa del residuo sólido obtenido es de 9,7%, en concordancia con el valor teórico esperado de 9,6% para el residuo sólido de CuO que se confirma por espectroscopía FTIR.

Para el compuesto no hidratado, $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$, el termograma presenta un comportamiento similar excepto por el primer paso correspondiente a la pérdida del agua (Figura 1B). La descomposición se inicia a 170°C y el residuo a 800°C también se identifica como CuO con una pérdida de masa del 9,9% que ajusta razonablemente bien con el calculado de 9,7%.

(A)



(B)

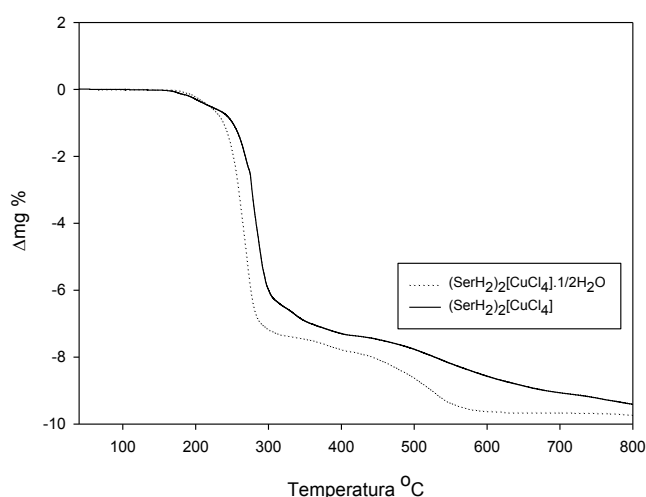


Figura 1. (A) Curvas termogravimétrica (TGA: línea negra) y diferencial termogravimétrica (DTA: línea roja), del complejo sólido $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ en atmósfera de O_2 , con una velocidad de flujo de 50,0 mL/min. (B) Superposición de las curvas termogravimétricas para $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.

3.1.2. Síntesis de los compuestos derivados de cobre y metimidazol:

[Cu(C₄H₅N₂S)₂Cl₂].2H₂O (1):

La síntesis del complejo se inicia con la preparación de una solución donde se mezclan soluciones de imidazol y metimidazol de acuerdo al siguiente procedimiento: una solución etanólica (10 mL) conteniendo 2 mmoles (0,136 g) de imidazol se añade a una solución acuosa (20 mL) conteniendo 2 mmoles (0,228 g) de metimidazol. La solución resultante se agita durante unos minutos y se ajusta el pH a 9 mediante el agregado lento de NaOH 1M. Sobre dicha mezcla, se añade posteriormente de forma lenta y bajo agitación continua, 1 mmol (0,170 g) de CuCl₂.2H₂O sólido. La solución azul resultante se deja a temperatura ambiente con agitación continua por 5 horas obteniéndose un precipitado de color azul oscuro, el cual se separa de la mezcla de reacción mediante centrifugación y se lava sucesivamente con una mezcla de agua-etanol (1:1). El sólido obtenido se seca en estufa a 60°C.

[Cu(C₈H₁₀N₄S)SO₄H₂O] (2):

Se prepara una solución 0,01M de [Cu(C₄H₅N₂S)₂Cl₂].2H₂O en dimetilacetamida: acetona (1:0,25). La solución resultante se deja reposar bajo campana a temperatura ambiente. Después de varias semanas se obtienen cristales de color verde; estos son filtrados y lavados sucesivamente con etanol 96% para su posterior caracterización

[Cu(C₈H₁₀N₄S)SO₄] (3):

Este complejo de color celeste, se obtiene por deshidratación del [Cu(C₈H₁₀N₄S)SO₄H₂O]. Durante el estudio de la descomposición termogravimétrica se observa la formación de un compuesto estable en el rango de temperatura de 165-250°C (ver apartado 3.1.2.2). El aislamiento y caracterización del producto obtenido se corresponde con la pérdida de la molécula de agua del compuesto de partida (ver abajo).

Durante el trabajo de tesis doctoral donde se intenta preparar complejos de Cu(II) que contengan metimidazol e imidazol como ligandos, se obtiene un complejo de color azul intenso en el cual se detecta posteriormente la presencia del ligando metimidazol transformado en el cual dos moléculas se oxidaron generando un puente disulfuro. Este nuevo ligando coordina por medio de los sitios de nitrógeno y también se encuentran los cloruros en la esfera de coordinación del centro metálico.

Datos de la literatura refieren a la existencia de múltiples posibilidades de formación de diferentes tipos de especies químicas. Trabajando con metimidazol, se establece un proceso de oxidación dependiente de los solventes utilizados, la atmósfera empleada, el estado de oxidación del cobre, la sal de partida (por ejemplo, si se utilizó Cu(I) o Cu(II) como fuente del metal o el tipo de sal precursora como nitrato, sulfato, cloruro, etc) entre otras condiciones químicas. Por ejemplo, la estabilización del ligando metimidazol se logró con complejos preparados previamente en nuestro grupo

$[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ donde se utilizó $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ como reactivo de partida¹.

Además, es conocida la formación de complejos de valencia mixta de cobre $\text{Cu}(\text{II})/\text{Cu}(\text{I})$ en los casos que se utilizaron otras sales de cobre como reactivos^{2,3}.

En este trabajo (Figura 2), el imidazol y el $\text{pH} = 9$ actuaron como agentes estabilizadores del $\text{Cu}(\text{II})$ en solución agua-etanol que conducen a la formación del complejo azul, $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, complejo(1) (Figura 2, Etapa 1). Al final de la reacción, el ligando imidazol no forma parte del complejo. Esto pudo deducirse ya que el típico complejo $[\text{Cu}(\text{Imz})_4]^{2+}$ (Imz = imidazol) pudo detectarse mediante el espectro UV-Vis en la solución resultante.

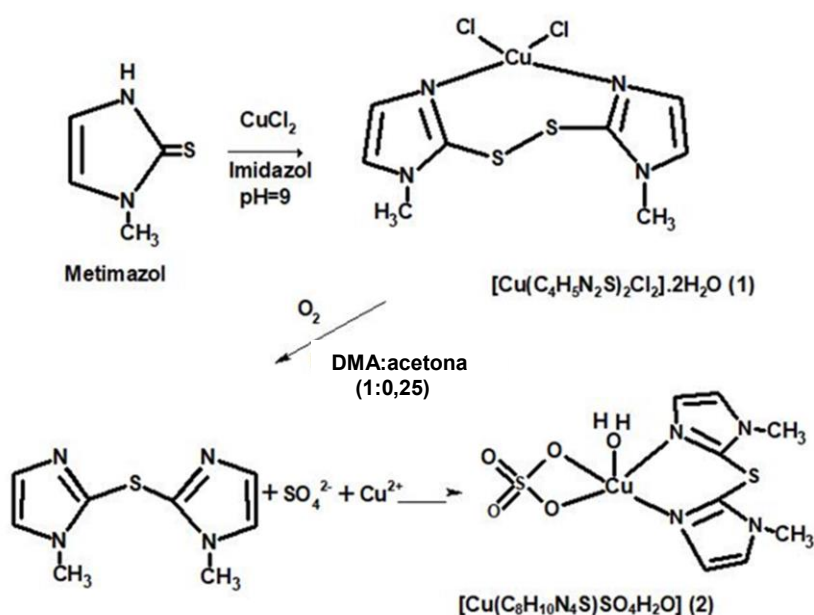


Figura 2. Esquema de la síntesis de los complejos $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2).

Por otro lado, varios intentos de cristalizar el complejo(1) condujeron a la segunda transformación del ligando dando lugar a la formación del complejo $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2) (Figura 2, Etapa 2). La determinación estructural por rayos X para este complejo (datos no mostrados) nos permitió confirmar que la estructura de este complejo fue reportada previamente⁴. La diferencia con el reporte previo se encuentra en el procedimiento de preparación, el que es muy diferente a lo implementado en este trabajo. En esa oportunidad usando bromuro de cobre(I) con 1-metil-1,3-imidazolina-2-tiona y DMSO como solvente permitieron obtener el complejo. Por tanto, si bien la estructura cristalina del

¹ N.M Urquiza, S.G Manca, M.A Moyano, R. Arrieta Dellmans, L. Lezama, T. Rojo, L.G Naso, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Biometals*. **2010**. 23, 255-264.

² E.S Raper. *Coord Chem Rev*. **1996**. 153, 199-255.

³ E.S Raper. *Coord Chem Rev*. **1997**. 165, 475-567.

⁴ T.S Lobana, R. Sultana, G. Hundal, R.J Butcher. *Dalton Trans*. **2010**. 39, 7870-7872.

complejo está reportada, se reporta en esta tesis otra vía válida de síntesis y una caracterización completa así como actividades biológicas para el mismo.

3.1.2.1. Análisis elementales:

En líneas generales, los porcentajes de carbono, hidrógeno, nitrógeno, azufre, y cloro determinados experimentalmente concuerdan con los porcentajes teóricos calculados a partir de las fórmulas moleculares propuestas para cada uno de ellos.

Complejo (1): Anal. Calc. $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ %: C: 24,2; H: 3,5; N: 14,1 ; S: 16,1; y Cl: 17,9. Exp. %: C: 24,3; H: 3,4; N: 14,1; S: 15,8; y Cl: 17,6.

Complejo (2): Anal. Calc. $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ %: C: 25,8; H: 3,2; N: 15,07 ; S: 16,1. Exp. %: C: 25,7; H: 3,3; N: 15,1 ; S: 17,3.

Complejo (3): Anal. Calc. $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]$ %: C: 27,1; H: 2,8; N: 15,8 ; S: 18,1. Exp. %: C: 26,8; H: 3,0; N: 15,7 ; S: 17,3.

3.1.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)

$[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$

El análisis termogravimétrico se realiza en una atmósfera de oxígeno (50 mL/min): No se observa la pérdida de agua. La descomposición de la muestra se produce con tres pérdidas de masa sucesivas con picos exotérmicos a 187,6°C (593,2 J/g), 277,5°C (1,14 kJ/g) y 465,7°C (3,04 kJ/g). El producto final de la descomposición térmica no pudo identificarse.

$[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4](3)$

El análisis termogravimétrico (atmósfera de oxígeno, 50 mL/min) del complejo (2) plantea la pérdida de las moléculas de agua de coordinación dado que se observa la pérdida de masa a temperaturas mayores de 100 °C, acompañada de un pico endotérmico en el DTA, (136 °C, $\Delta H = 213,6$ J/g) que implica un porcentaje de pérdida de masa del 4,9 % en concordancia con el valor teórico calculado (Δm calc = 4,8 %) (Figura 3). Después de la pérdida del agua, el compuesto se degrada en una serie de dos etapas consecutivas observadas a temperaturas superiores a 250 °C acompañado de picos exotérmicos en el DTA localizados a 317 °C, 520 °C y 534 °C. El residuo finalmente se obtiene a temperaturas mayores de 650 °C siendo el peso del residuo sólido de 20,9 % coincidiendo con el valor esperado de 21,3 % de acuerdo a los cálculos realizados. La presencia de CuO en el residuo se confirmó mediante espectroscopía FTIR.

Como se mencionara, el complejo (3) se obtuvo mediante la descomposición térmica del complejo original (2). La ruta de síntesis, fue seguida por TGA/DTA en la que se obtuvo una meseta después de la pérdida de la molécula de agua coordinada en un rango de temperatura de 165-250 °C (Figura 3).

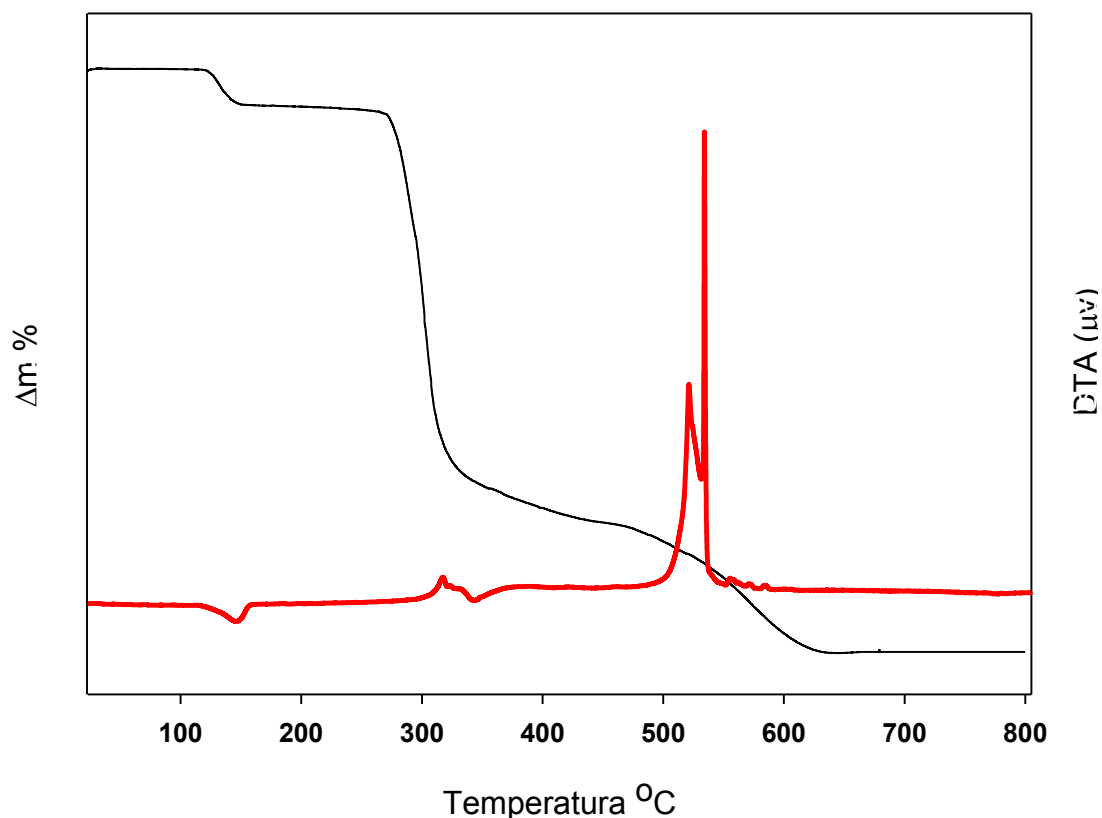


Figura 3. Curvas termogravimétrica (TGA: línea negra) y diferencial termogravimétrica (DTA: línea roja), del complejo sólido $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}]$ en atmósfera de O_2 , con una velocidad de flujo de 50,0 mL/min.

3.1.3. Síntesis del compuesto derivado de Mg(II) y ácido piroglutámico **Síntesis de $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$**

El nuevo compuesto fue sintetizado mediante reacción en bombas solvotermales, mezclando 1 mmol de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 1 mmol ácido de DL-piroglutámico (ácido DL-pGlu) en 3,5 mL de N,N-dimetilacetamida como solvente. La mezcla se dejó reaccionando a 100 °C durante 5 días. Luego los cristales obtenidos fueron lavados sucesivas veces con dimetilacetamida, filtrados en papel y posteriormente secados a temperatura ambiente durante varios días. Posteriormente, los cristales obtenidos fueron analizados por diversas técnicas fisicoquímicas como FTIR, Raman, y también por difracción por rayos X para determinar su estructura cristalográfica.

El compuesto también puede obtenerse en forma de polvo microcristalino utilizando mayores proporciones de reactivos en la misma cantidad de volumen que la usada en durante la síntesis solvotérmica.

3.1.3.1. Análisis elementales:

Este estudio determinó que la composición porcentual experimental de los distintos elementos que componen el compuesto coincide con el análisis porcentual calculado.

Complejo $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{MgN}_2\text{O}_6$: Exp %: C: 42,5; H: 4,1; N: 9,8; Calc %: C: 42,8; H: 4,3; N: 10,0.

El compuesto sólido es estable al aire y es soluble en agua, en dimetilsulfóxido caliente (DMSO) y también en solución dimetiformamida (DMF): H_2O en una relación 10:1.

3.1.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA):

Durante el análisis termogravimétrico, las condiciones empleadas fueron: velocidad = 10 °C /min y flujo de aire = 50 mL/min (Figura 4). El compuesto permanece estable hasta los 320 °C. Luego con el aumento de la temperatura, comienza a perder peso, lo que ocurre en tres etapas sucesivas: la primera etapa en un rango de temperaturas entre 320-422 °C con una pérdida de peso del 28,8 %, la segunda se da entre 422-468 °C con $\Delta m_{\text{exp}} = 33,5$ % y la tercera es de $\Delta m_{\text{exp}} = 22,2$ % entre 500-526 °C. La descomposición total ocurre cuando la temperatura llega a los 800 °C con una pérdida del 86 % respecto a la cantidad de masa inicial. El residuo obtenido se corresponde con un 14,3 % respecto a la cantidad inicial de compuesto. Este valor coincide con el porcentaje calculado cuando se considera que el MgO es el producto de descomposición y los análisis por espectroscopía FTIR confirman su presencia.

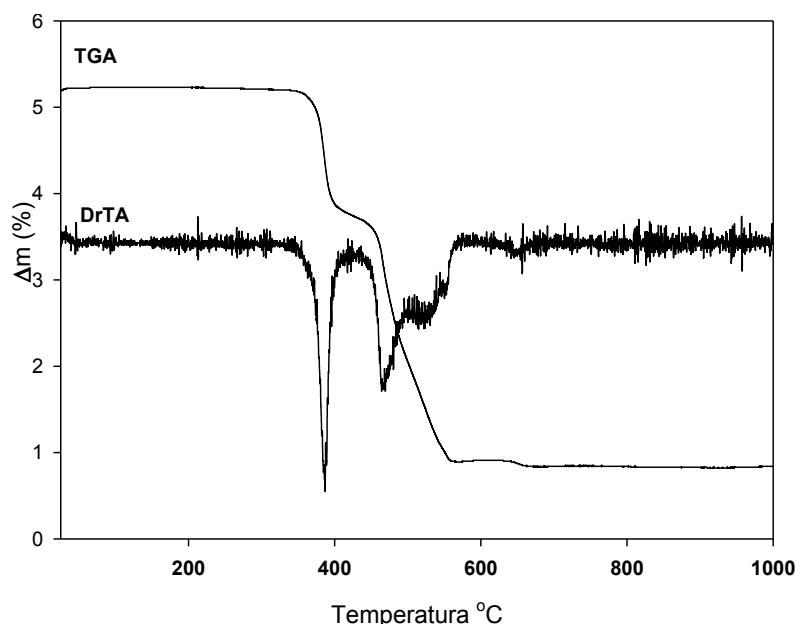


Figura 4. Análisis termogravimétrico (TGA) para $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ y su primera derivada (DrTA).

3.1.4. Síntesis de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (MgDMA)

La preparación de este complejo a base de Mg(II), se realiza mediante el agregado directo de una sal del metal sobre una solución del ligando, N,N-dimetilacetamida. La síntesis consiste en añadir lentamente 2 mmoles de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sólido, sobre una solución conteniendo 1 mmol de N,N-dimetilacetamida caliente (10 mL) bajo agitación magnética. La mezcla de reacción se deja a reflujo a 100 °C durante dos horas. La solución resultante se deja reposar por 48 horas, después de este tiempo se observa la formación de cristales incoloros. Estos cristales son lavados con N, N-dimetilacetamida, filtrados y secados al aire, posteriormente son utilizados para ser analizados fisicoquímicamente. El rendimiento de la preparativa es del 80-88%.

3.1.4.1. Análisis elementales

La composición porcentual experimental de los distintos elementos que componen el nuevo compuesto coincide razonablemente con el análisis porcentual calculado

Complejo: $\text{C}_8\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{MgN}_2\text{O}_8$: Calc %: C: 25,43; H: 7,95; N: 7,42; Exp %: C: 25,50; H: 7,87; N: 7,48.

El compuesto sólido es estable al aire y es soluble en agua, etanol, dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2. Caracterización de las estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X.

3.2.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

La caracterización estructural mediante difracción de rayos X dio lugar a los resultados que se muestran a continuación. Como puede observarse en la Figura 5A, la forma hidratada (hemihidrato) contiene dos moléculas diferentes que comparten una única molécula de agua de cristalización mientras que la unidad cristalina asimétrica de la forma no-hidratada alberga una única molécula (Figura 5B).

Los datos de los cristales, del procedimiento de colección de datos de difracción y del refinamiento de la estructura se encuentran compendiados en las Tabla 1 mientras que las distancias y ángulos de enlaces intra-moleculares correspondientes se encuentran en las Tablas 2 y 3.

Tabla 1. Datos de los cristales y resultados del refinamiento estructural para las sales de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

	Forma hidratada	Forma no hidratada
Fórmula empírica	$\text{C}_{34}\text{H}_{37}\text{Cl}_8\text{CuN}_2\text{O}_{0,5}$	$\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{Cl}_8\text{CuN}_2$
Peso Molecular	828,79	819,79
Temperatura (K)	297(2)	297(2)
Longitud de onda (Å)	0,71073	1,54184
Sistema Cristalino	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	$P2_1$	$P2_1$
Dimensiones de Celda Unidad		
	a (Å) 8,0807(2)	13,8727(6)
	b (Å) 36,2781(8)	7,5090(3)
	c (Å) 12,6576(3)	18,618(1)
	β (°) 95,665(2)	104,563(6)
Volumen (Å ³)	3692,5(2)	1877,1(2)
Z, densidad (calculada)	4; 1,491 mg/m ³	2; 1,450 mg/m ³
Coeficiente de Absorción	1,200 mm ⁻¹	6,267 mm ⁻¹
F(000)	1696	838
Forma/color del cristal	Fragmento/amarillo	Fragmento /amarillo
Dimensiones del cristal (mm ³)	0,237 x 0,083 x 0,037	0,375 x 0,176 x 0,051
Rango- θ en recolección de datos	2,868 a 27,000	3,291 a 72,396
Rangos de Índices de Miller	$-9 \leq h \leq 10$, $-43 \leq k \leq 45$, $-16 \leq l \leq 16$	$-17 \leq h \leq 16$, $-9 \leq k \leq 5$, $-22 \leq l \leq 22$
Reflexiones recolectadas	22045	8261
Reflexiones Independientes	13434 [R(int) = 0,0292]	4754 [R(int) = 0,0612]
Reflexiones observadas [$I > 2\sigma(I)$]	11104	3244
Compleitud (%) hasta $\theta = 25,24^\circ$	99,8	99,9
Corrección de absorción	Semi-empíricos a partir de equivalentes Cuadrados mínimos, matriz completa en F ²	Semi-empíricos a partir de equivalentes Cuadrados mínimos, matriz completa en F ²
Método de refinamiento		
Datos / restricciones / parámetros	13434 / 2 / 828	4754 / 1 / 408
Bondad de ajuste en F ²	1,021	1,025
Índices R finales ^a [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0392, wR2 = 0,0746	R1 = 0,0719, wR2 = 0,1714
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0536, wR2 = 0,0808	R1 = 0,1047 wR2 = 0,1996
Parámetro de estructura absoluta	-0,003(7)	0,03(4)
Mayor diferencia pico y hueco (e, Å-3)	0,317 y -0,303	1,272 y -0,456

$$^a R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|, wR_2 = [\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2 / \sum w(|F_o|^2)^2]^{1/2}$$

Tabla 2. Distancias [Å] y ángulos [°] de enlace para (SerH₂)₂[CuCl₄].½H₂O.

C(1)-N(1)	1,493(6)	C(314)-C(315)	1,510(7)
C(11)-C(12)	1,373(6)	C(314)-N(3)	1,525(7)
C(11)-C(16)	1,378(7)	C(315)-C(316)	1,525(7)
C(11)-Cl(1A)	1,732(5)	C(4)-N(4)	1,494(6)
C(12)-C(13)	1,379(6)	C(41)-C(42)	1,373(7)
C(12)-Cl(1B)	1,728(5)	C(41)-C(46)	1,376(7)
C(13)-C(14)	1,382(6)	C(41)-Cl(4A)	1,733(5)
C(14)-C(15)	1,385(6)	C(42)-C(43)	1,383(7)
C(14)-C(17)	1,506(6)	C(42)-Cl(4B)	1,730(5)
C(15)-C(16)	1,374(7)	C(43)-C(44)	1,378(7)
C(17)-C(116)	1,524(7)	C(44)-C(45)	1,390(6)
C(17)-C(18)	1,527(6)	C(44)-C(47)	1,509(6)
C(18)-C(19)	1,389(7)	C(45)-C(46)	1,383(7)
C(18)-C(113)	1,409(6)	C(47)-C(48)	1,521(7)
C(19)-C(110)	1,373(7)	C(47)-C(416)	1,531(7)
C(110)-C(111)	1,381(7)	C(48)-C(49)	1,380(7)
C(111)-C(112)	1,357(7)	C(48)-C(413)	1,403(6)
C(112)-C(113)	1,400(7)	C(49)-C(410)	1,391(8)
C(113)-C(114)	1,504(7)	C(410)-C(411)	1,365(8)
C(114)-C(115)	1,502(7)	C(411)-C(412)	1,367(7)
C(114)-N(1)	1,519(6)	C(412)-C(413)	1,394(7)
C(115)-C(116)	1,537(7)	C(413)-C(414)	1,509(7)
C(2)-N(2)	1,487(6)	C(414)-C(415)	1,500(6)
C(21)-C(26)	1,369(8)	C(414)-N(4)	1,513(5)
C(21)-C(22)	1,365(7)	C(415)-C(416)	1,516(7)
C(21)-Cl(2A)	1,724(5)	Cl(11)-Cu(1)	2,2875(12)
C(22)-C(23)	1,381(7)	Cl(12)-Cu(1)	2,2648(13)
C(22)-Cl(2B)	1,722(6)	Cl(13)-Cu(1)	2,2316(13)
C(23)-C(24)	1,391(7)	Cl(14)-Cu(1)	2,2044(15)
C(24)-C(25)	1,369(6)	Cl(21)-Cu(2)	2,2522(12)
C(24)-C(27)	1,526(6)	Cl(22)-Cu(2)	2,2451(13)
C(25)-C(26)	1,386(7)	Cl(23)-Cu(2)	2,2242(13)
C(27)-C(28)	1,515(7)	Cl(24)-Cu(2)	2,2547(15)
C(27)-C(216)	1,519(7)		
C(28)-C(29)	1,392(7)	C(12)-C(11)-C(16)	119,8(4)
C(28)-C(213)	1,406(7)	C(12)-C(11)-Cl(1A)	121,0(4)
C(29)-C(210)	1,368(8)	C(16)-C(11)-Cl(1A)	119,2(4)
C(210)-C(211)	1,379(8)	C(11)-C(12)-C(13)	119,6(4)
C(211)-C(212)	1,381(7)	C(11)-C(12)-Cl(1B)	120,8(4)
C(212)-C(213)	1,390(7)	C(13)-C(12)-Cl(1B)	119,6(4)
C(213)-C(214)	1,518(7)	C(12)-C(13)-C(14)	121,6(4)
C(214)-N(2)	1,503(6)	C(13)-C(14)-C(15)	117,7(4)
C(214)-C(215)	1,518(7)	C(13)-C(14)-C(17)	120,7(4)
C(215)-C(216)	1,519(8)	C(15)-C(14)-C(17)	121,5(4)
C(3)-N(3)	1,469(7)	C(16)-C(15)-C(14)	121,1(5)
C(31)-C(32)	1,369(7)	C(15)-C(16)-C(11)	120,2(4)
C(31)-C(36)	1,382(7)	C(14)-C(17)-C(116)	113,8(4)
C(31)-Cl(3A)	1,731(5)	C(14)-C(17)-C(18)	111,6(4)
C(32)-C(33)	1,389(7)	C(116)-C(17)-C(18)	111,3(4)
C(32)-Cl(3B)	1,734(5)	C(19)-C(18)-C(113)	117,9(4)
C(33)-C(34)	1,377(7)	C(19)-C(18)-C(17)	120,5(4)
C(34)-C(35)	1,389(7)	C(113)-C(18)-C(17)	121,5(4)
C(34)-C(37)	1,523(7)	C(110)-C(19)-C(18)	122,2(5)
C(35)-C(36)	1,358(7)	C(19)-C(110)-C(111)	119,5(5)
C(37)-C(38)	1,521(7)	C(112)-C(111)-C(110)	119,9(5)
C(37)-C(316)	1,526(7)	C(111)-C(112)-C(113)	121,7(5)
C(38)-C(313)	1,392(7)	C(112)-C(113)-C(18)	118,8(5)
C(38)-C(39)	1,397(7)	C(112)-C(113)-C(114)	119,6(4)
C(39)-C(310)	1,384(8)	C(18)-C(113)-C(114)	121,6(4)
C(310)-C(311)	1,369(9)	C(115)-C(114)-C(113)	113,3(4)
C(311)-C(312)	1,358(8)	C(115)-C(114)-N(1)	112,3(4)
C(312)-C(313)	1,392(7)	C(113)-C(114)-N(1)	108,9(4)
C(313)-C(314)	1,513(7)	C(114)-C(115)-C(116)	111,1(4)

C(17)-C(116)-C(115)	108,8(4)	C(311)-C(312)-C(313)	121,9(6)
C(1)-N(1)-C(114)	115,8(4)	C(38)-C(313)-C(312)	119,4(5)
C(26)-C(21)-C(22)	120,4(5)	C(38)-C(313)-C(314)	120,9(5)
C(26)-C(21)-Cl(2A)	118,4(4)	C(312)-C(313)-C(314)	119,7(5)
C(22)-C(21)-Cl(2A)	121,2(4)	C(315)-C(314)-C(313)	112,6(4)
C(21)-C(22)-C(23)	120,4(5)	C(315)-C(314)-N(3)	109,4(4)
C(21)-C(22)-Cl(2B)	120,4(4)	C(313)-C(314)-N(3)	109,6(4)
C(23)-C(22)-Cl(2B)	119,2(4)	C(314)-C(315)-C(316)	110,5(4)
C(22)-C(23)-C(24)	120,2(5)	C(315)-C(316)-C(37)	111,0(4)
C(25)-C(24)-C(23)	118,2(4)	C(3)-N(3)-C(314)	114,6(5)
C(25)-C(24)-C(27)	122,9(4)	C(42)-C(41)-C(46)	119,6(4)
C(23)-C(24)-C(27)	118,9(4)	C(42)-C(41)-Cl(4A)	121,4(4)
C(24)-C(25)-C(26)	121,7(5)	C(46)-C(41)-Cl(4A)	119,0(4)
C(21)-C(26)-C(25)	119,1(5)	C(41)-C(42)-C(43)	120,5(5)
C(28)-C(27)-C(216)	110,8(4)	C(41)-C(42)-Cl(4B)	120,6(4)
C(28)-C(27)-C(24)	112,3(4)	C(43)-C(42)-Cl(4B)	118,9(4)
C(216)-C(27)-C(24)	112,0(4)	C(44)-C(43)-C(42)	121,0(4)
C(29)-C(28)-C(213)	118,1(5)	C(43)-C(44)-C(45)	117,9(4)
C(29)-C(28)-C(27)	119,2(5)	C(43)-C(44)-C(47)	120,5(4)
C(213)-C(28)-C(27)	122,7(5)	C(45)-C(44)-C(47)	121,5(4)
C(210)-C(29)-C(28)	122,3(5)	C(46)-C(45)-C(44)	121,2(4)
C(29)-C(210)-C(211)	119,7(5)	C(41)-C(46)-C(45)	119,9(4)
C(210)-C(211)-C(212)	119,3(5)	C(44)-C(47)-C(48)	113,5(4)
C(211)-C(212)-C(213)	121,7(5)	C(44)-C(47)-C(416)	113,6(4)
C(212)-C(213)-C(28)	118,9(5)	C(48)-C(47)-C(416)	110,7(4)
C(212)-C(213)-C(214)	120,1(4)	C(49)-C(48)-C(413)	118,1(5)
C(28)-C(213)-C(214)	120,9(4)	C(49)-C(48)-C(47)	120,4(4)
N(2)-C(214)-C(213)	110,1(4)	C(413)-C(48)-C(47)	121,3(4)
N(2)-C(214)-C(215)	110,2(4)	C(48)-C(49)-C(410)	121,9(5)
C(213)-C(214)-C(215)	113,4(4)	C(411)-C(410)-C(49)	119,2(5)
C(214)-C(215)-C(216)	109,7(4)	C(410)-C(411)-C(412)	120,4(6)
C(27)-C(216)-C(215)	111,3(4)	C(411)-C(412)-C(413)	121,1(5)
C(2)-N(2)-C(214)	114,5(4)	C(412)-C(413)-C(48)	119,3(5)
C(32)-C(31)-C(36)	118,8(5)	C(412)-C(413)-C(414)	118,8(4)
C(32)-C(31)-Cl(3A)	121,0(4)	C(48)-C(413)-C(414)	121,9(4)
C(36)-C(31)-Cl(3A)	120,1(4)	C(415)-C(414)-C(413)	113,4(4)
C(31)-C(32)-C(33)	120,4(5)	C(415)-C(414)-N(4)	111,3(4)
C(31)-C(32)-Cl(3B)	121,1(4)	C(413)-C(414)-N(4)	109,5(3)
C(33)-C(32)-Cl(3B)	118,5(4)	C(414)-C(415)-C(416)	112,2(4)
C(34)-C(33)-C(32)	120,5(5)	C(415)-C(416)-C(47)	109,3(4)
C(33)-C(34)-C(35)	118,3(5)	C(4)-N(4)-C(414)	113,8(3)
C(33)-C(34)-C(37)	119,8(4)	Cl(14)-Cu(1)-Cl(13)	131,81(7)
C(35)-C(34)-C(37)	121,8(4)	Cl(14)-Cu(1)-Cl(12)	103,90(6)
C(36)-C(35)-C(34)	120,8(5)	Cl(13)-Cu(1)-Cl(12)	100,41(5)
C(35)-C(36)-C(31)	121,0(5)	Cl(14)-Cu(1)-Cl(11)	99,94(5)
C(38)-C(37)-C(34)	113,3(4)	Cl(13)-Cu(1)-Cl(11)	98,83(5)
C(38)-C(37)-C(316)	112,6(4)	Cl(12)-Cu(1)-Cl(11)	125,36(6)
C(34)-C(37)-C(316)	110,4(4)	Cl(23)-Cu(2)-Cl(22)	96,25(5)
C(313)-C(38)-C(39)	118,0(5)	Cl(23)-Cu(2)-Cl(21)	139,55(6)
C(313)-C(38)-C(37)	122,6(4)	Cl(22)-Cu(2)-Cl(21)	98,34(6)
C(39)-C(38)-C(37)	119,3(5)	Cl(23)-Cu(2)-Cl(24)	97,90(6)
C(310)-C(39)-C(38)	121,2(6)	Cl(22)-Cu(2)-Cl(24)	141,23(7)
C(311)-C(310)-C(39)	120,0(6)	Cl(21)-Cu(2)-Cl(24)	93,85(6)
C(312)-C(311)-C(310)	119,5(6)		

Tabla 3. Distancias [Å] y ángulos [°] de enlace para (SerH₂)₂[CuCl₄]

C(1)-N(1)	1,472(14)	C(14)-C(15)-C(16)	120,8(10)
C(11)-C(12)	1,360(18)	C(11)-C(16)-C(15)	119,9(12)
C(11)-C(16)	1,380(16)	C(14)-C(17)-C(18)	114,7(9)
C(11)-Cl(1A)	1,715(13)	C(14)-C(17)-C(116)	110,8(9)
C(12)-C(13)	1,363(17)	C(18)-C(17)-C(116)	111,9(9)
C(12)-Cl(1B)	1,741(12)	C(113)-C(18)-C(19)	118,2(10)
C(13)-C(14)	1,415(14)	C(113)-C(18)-C(17)	124,4(10)
C(14)-C(15)	1,387(16)	C(19)-C(18)-C(17)	117,3(10)
C(14)-C(17)	1,508(15)	C(110)-C(19)-C(18)	120,5(12)
C(15)-C(16)	1,387(15)	C(19)-C(110)-C(111)	119,8(12)
C(17)-C(18)	1,538(14)	C(112)-C(111)-C(110)	119,7(11)
C(17)-C(116)	1,544(17)	C(111)-C(112)-C(113)	121,0(12)
C(18)-C(113)	1,370(15)	C(18)-C(113)-C(112)	120,8(12)
C(18)-C(19)	1,412(15)	C(18)-C(113)-C(114)	119,4(10)
C(19)-C(110)	1,366(17)	C(112)-C(113)-C(114)	119,7(11)
C(110)-C(111)	1,394(19)	C(113)-C(114)-N(1)	112,1(10)
C(111)-C(112)	1,354(19)	C(113)-C(114)-C(115)	112,5(10)
C(112)-C(113)	1,377(15)	N(1)-C(114)-C(115)	108,3(10)
C(113)-C(114)	1,520(15)	C(116)-C(115)-C(114)	111,0(11)
C(114)-N(1)	1,515(15)	C(115)-C(116)-C(17)	110,8(9)
C(114)-C(115)	1,506(17)	C(1)-N(1)-C(114)	117,4(9)
C(115)-C(116)	1,506(17)	C(22)-C(21)-C(26)	120,5(12)
C(2)-N(2)	1,463(13)	C(22)-C(21)-Cl(2A)	122,2(11)
C(21)-C(22)	1,360(19)	C(26)-C(21)-Cl(2A)	117,4(11)
C(21)-C(26)	1,397(17)	C(21)-C(22)-C(23)	120,8(11)
C(21)-Cl(2A)	1,736(13)	C(21)-C(22)-Cl(2B)	121,4(12)
C(22)-C(23)	1,389(19)	C(23)-C(22)-Cl(2B)	117,8(11)
C(22)-Cl(2B)	1,729(11)	C(24)-C(23)-C(22)	119,8(12)
C(23)-C(24)	1,368(16)	C(23)-C(24)-C(25)	119,7(11)
C(24)-C(25)	1,405(16)	C(23)-C(24)-C(27)	118,9(10)
C(24)-C(27)	1,546(16)	C(25)-C(24)-C(27)	121,4(10)
C(25)-C(26)	1,382(16)	C(26)-C(25)-C(24)	120,4(11)
C(27)-C(28)	1,519(16)	C(21)-C(26)-C(25)	118,8(12)
C(27)-C(216)	1,546(16)	C(28)-C(27)-C(24)	114,0(10)
C(28)-C(29)	1,373(15)	C(28)-C(27)-C(216)	112,3(9)
C(28)-C(213)	1,408(15)	C(24)-C(27)-C(216)	110,3(10)
C(29)-C(210)	1,364(17)	C(29)-C(28)-C(213)	118,0(11)
C(210)-C(211)	1,397(19)	C(29)-C(28)-C(27)	120,6(11)
C(211)-C(212)	1,382(19)	C(213)-C(28)-C(27)	121,3(10)
C(212)-C(213)	1,375(16)	C(210)-C(29)-C(28)	124,1(12)
C(213)-C(214)	1,524(14)	C(29)-C(210)-C(211)	117,4(12)
C(214)-N(2)	1,488(14)	C(212)-C(211)-C(210)	120,1(13)
C(214)-C(215)	1,517(15)	C(211)-C(212)-C(213)	121,4(13)
C(215)-C(216)	1,494(19)	C(212)-C(213)-C(28)	119,0(10)
Cl(1)-Cu	2,262(3)	C(212)-C(213)-C(214)	118,9(10)
Cl(2)-Cu	2,215(3)	C(28)-C(213)-C(214)	122,0(10)
Cl(3)-Cu	2,254(3)	N(2)-C(214)-C(215)	112,4(10)
Cl(4)-Cu	2,251(3)	N(2)-C(214)-C(213)	109,5(8)
		C(215)-C(214)-C(213)	111,7(9)
C(12)-C(11)-C(16)	119,4(12)	C(216)-C(215)-C(214)	112,7(9)
C(12)-C(11)-Cl(1A)	122,2(9)	C(215)-C(216)-C(27)	108,8(11)
C(16)-C(11)-Cl(1A)	118,4(11)	C(214)-N(2)-C(2)	114,7(9)
C(13)-C(12)-C(11)	122,3(11)	Cl(2)-Cu-Cl(4)	99,41(15)
C(13)-C(12)-Cl(1B)	116,5(11)	Cl(2)-Cu-Cl(3)	137,39(14)
C(11)-C(12)-Cl(1B)	121,2(10)	Cl(4)-Cu-Cl(3)	98,52(12)
C(12)-C(13)-C(14)	119,4(11)	Cl(2)-Cu-Cl(1)	99,11(16)
C(15)-C(14)-C(13)	118,1(10)	Cl(4)-Cu-Cl(1)	127,66(14)
C(15)-C(14)-C(17)	122,1(9)	Cl(3)-Cu-Cl(1)	99,84(13)
C(13)-C(14)-C(17)	119,7(10)		

Los datos que se discutirán a continuación corresponden a la estructura molecular de la sal hidratada cuyo refinamiento fue de mayor calidad.

La especie SerH_2^+ sólida se halla en su forma catiónica protonada en el grupo amino, esto es (1S, 4S)-4-(3,4-diclorofenil)-N-metil-1,2,3,4-tetrahidro naftalen-1-amino.

Debido a una extensa deslocalización del orbital molecular π , los grupos fenilo y diclorofenilo de SerH_2^+ son planares (raíz de la desviación cuadrática media de átomos no-H del mejor plano por cuadrados mínimos: $\text{rms} < 0,010 \text{ \AA}$ para anillos de fenilo y $\text{rms} < 0,031 \text{ \AA}$ para los grupos diclorofenilo). Los planos subtienden ángulos diedros de $87,9(1)^\circ$ (SerH # 1); $81,3(1)^\circ$ (SerH # 2); $68,8(1)^\circ$ (SerH # 3) y $86,5(1)^\circ$ (SerH # 4)

Las distancias y ángulos de enlaces inter-atómicos de ambas moléculas de SerH_2^+ en ambas sales concuerdan entre sí y con los valores correspondientes reportados para la sal $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]^5$, para polimorfos de clorhidrato de sertralina^{6,7}, para otras sales de $\text{SerH}_2\text{Cl}^{8,9}$ y para la sertralina cumarin 3-carboxilato¹⁰.

Las cuatro moléculas independientes de SerH_2^+ en $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ se pueden agrupar en dos conjuntos, (# 1, # 3) y (# 2, # 4), con las moléculas de cada conjunto teniendo la misma conformación en forma de bote como los anillos de naftaleno. Además de esto, las conformaciones de las moléculas SerH_2^+ difieren significativamente entre sí y de la exhibida por otros compuestos relacionados.

Esto puede explicarse en términos de la relativa libertad rotacional intramolecular de SerH_2^+ alrededor del enlace- $\sigma\text{C-C}$ vinculando entre si los anillos diclorofenilos y naftaleno (naf) y también alrededor del enlace- $\sigma\text{C}(\text{naf})\text{-N}$.

Como es de esperar las mayores diferencias encontradas en la longitud de los enlaces de las moléculas de SerH_2^+ se hallan cuando son comparadas con la sertralina neutra¹¹, mostrándonos un alargamiento en torno a las distancias de los enlaces de $\text{C}(\text{naftaleno})\text{-N}$ (en promedio de $0,045(8) \text{ \AA}$) y en menor grado de N-CH_3 (en promedio de $0,022(8) \text{ \AA}$); cuando el protón está en los grupos amino.

Las distancias entre el cloruro y el cobre en el anión $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ oscilan entre $2,204(2)$ y $2,288(1) \text{ \AA}$. A pesar de la tendencia del ion Cu(II) para formar

⁵ G.E Escudero, C.H Laino, N. Martini, G.A Echeverría, O.E Piro, P.A.M Williams, E Ferrer. **2015**. (Patent Application N° 20150103320-Argentina).

⁶ K. Ravikumar, B. Sridhar, M.N Bhanu. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep.* **2006**. 62, 565-567.

⁷ F. Caruso, A. Besmer, M. Rossi. *Acta Crystallogr Sect C Cryst Struct Commun.* **1999**. 55, 1712-1714.

⁸ O. Almarsson, M.B Hickey, M.L Peterson, S.L Morissette, S. Soukasene, C. McNulty, M. Tawa, J.M MacPhee, J.F Remenar. *Cryst Growth Des.* **2003**. 3, 927-933.

⁹ Q. He, S. Rohani, J. Zhu, H. Goma. *Chirality.* **2012**. 24, 119-128.

¹⁰ G.E Escudero, C.H Laino, G.A Echeverría, O.E Piro, N. Martini, A.N Rodríguez, J.J Martínez Medina, L.L López Tévez, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *Chem Biol Interact.* **2016**. 249, 46-55.

¹¹ Q. He, S. Rohani, J. Zhu, H. Goma. *Cryst Growth Des.* **2010**. 10, 1633-1645.

complejos cuadrado planos, $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ muestra una conformación tetraédrica comprimido (a lo largo del eje C_2) con ángulos en su forma trans (Cl-Cu-Cl) que están en el rango de 125,36(6) a 141,23(7)° y en la forma cis con ángulos (Cl-Cu-Cl) en el rango 93,85(6)-103,90(6)°, lo que concuerda con una distorsión Jahn-Teller. Estas distorsiones fueron previamente establecidas para compuestos similares con otros cationes como N-bencilpiperazinio o N-(2-aminoetil morfolinio)¹². Esto contrasta con el contraión $[\text{ZnCl}_4]^{2-}$ de la sal $(\text{SerH}_2)_2[\text{ZnCl}_4]$ donde el ión Zn(II) , con 10 electrones en sus orbitales d, en el complejo se encuentra mucho más cerca de una geometría tetraédrica perfecta (las distancias de enlace Zn-Cl están en el rango de 2,251(2)–2,282(2) Å y los ángulos Cl-Zn-Cl están el rango de 105,69(7°) a 114,76 (7°)¹¹.

La sal cristalina es adicionalmente estabilizada por una red compleja de puentes de hidrógeno intermoleculares, involucrando al grupo NH_2^+ de la sertralina como grupo donador y como aceptor a las moléculas de H_2O [$d(\text{N}\dots\text{O}) = 2,798$ Å, $\angle(\text{N-H}\dots\text{Ow}) = 163,9$ Å y a átomos de cloro del complejos aniónico $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ (las distancias $(\text{N}\dots\text{Cl})$ están en el rango de 3,174-3,564 Å y los ángulos de enlace están en el rango de 119,5°–171,9°; además el enlace $\text{Ow-H}\dots\text{Cl}$ [$(\text{Ow-H}\dots\text{Cl})$ 3,226 Å, $\angle(\text{Ow-H}\dots\text{Cl}) = 151,5^\circ$]. La estructura del enlace de hidrógeno en las sales se detalla en las Tablas 4 y 5 a continuación:

Tabla 4. Distancias (Å) y ángulos (°) en el enlace de hidrógeno del $(\text{SerH})_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.

D-H	d(D-H)	d(H..A)	$\angle(\text{D-H..A})$	d(D..A)	A	Operación de simetría
N1-H1D	0,890	2,373	149,93	3,174	Cl21	[x+1, y, z]
N1-H1E	0,890	2,355	161,33	3,211	Cl12	
N2-H2D	0,890	2,453	140,39	3,189	Cl11	[x, y, z-1]
N2-H2E	0,890	2,418	171,89	3,301	Cl22	
N3-H3D	0,890	1,932	163,90	2,798	O1W	[-x, y+1/2, -z+1]
N3-H3E	0,890	2,394	165,67	3,263	Cl24	[-x, y+1/2, -z]
N4-H4D	0,890	2,889	119,50	3,416	Cl11	[x+1, y, z]
N4-H4D	0,890	2,501	155,79	3,333	Cl13	[x+1, y, z]
N4-H4E	0,890	2,929	129,73	3,564	Cl21	[x+1, y, z]
N4-H4E	0,890	2,677	149,51	3,473	Cl24	[x+1, y, z]
O1W-H1W	0,815	2,486	151,52	3,226	Cl11	

Tabla 5. Distancias(Å) y ángulos (°) en el enlace de hidrógeno del $(\text{SerH})_2[\text{CuCl}_4]$.

D-H	d(D-H)	d(H..A)	$\angle(\text{D-H..A})$	d(D..A)	A	Operación de simetría
N1-H1D	0,890	2,491	140,07	3,224	Cl1	
N1-H1E	0,890	2,379	154,31	3,205	Cl4	[x, y+1, z]
N2-H2D	0,890	2,365	168,24	3,241	Cl3	[-x+1, y-1/2, -z]
N2-H2E	0,890	2,435	147,69	3,222	Cl1	[-x+1, y-3/2, -z]

¹²R.G McDonald, M.J Riley, M.A Hitchman. *Inorg Chem.* **1988.** 27, 894-900.

3.2.2. Derivado del ácido DL-pGlu y Mg(II): $[\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2]$

La Figura 6 muestra el ORTEP¹³ dibujado del compuesto. Se sabe que el ácido DL-piroglutámico posee tres sitios posibles de coordinación: los grupos COOH, NH y C=O. La síntesis solvotermal causó la desprotonación del grupo carboxilato. Este grupo del anión piroglutamato (DL-pGlu) actúa como un ligando puente conectando a dos átomos de Mg(II) en la celda unidad.

Cada uno de los DL-pGlu coordina con el ión Mg(II) a través de los oxígenos del grupo carboxilato y del átomo de oxígeno del grupo carbonilo.

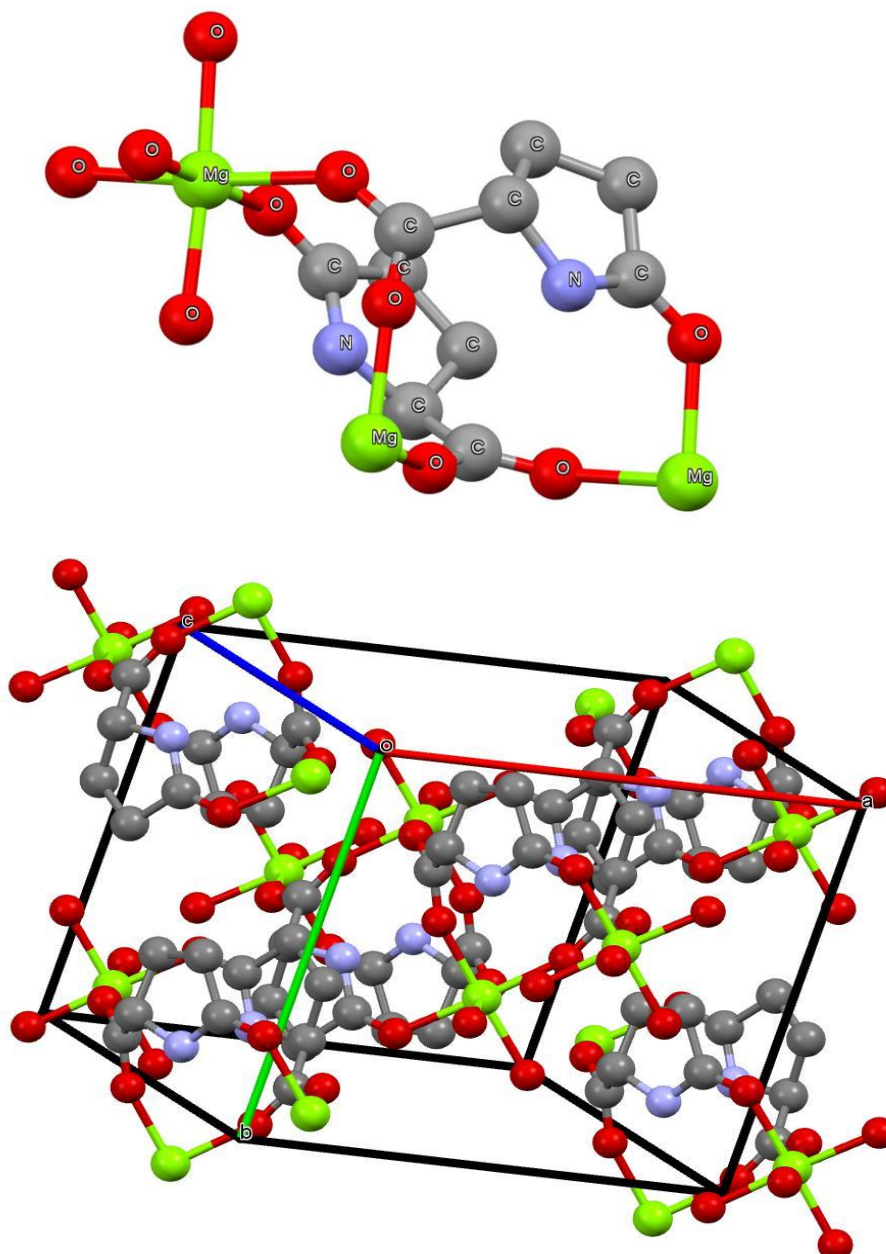


Figura 6. Vistas de la estructura cristalina de $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$. Identificación por colores: Mg, verde; O, rojo; N, azul; C, gris oscuro; H, gris claro.

¹³ L.J Farrugia. *J Appl Cryst.* **1997.** 30, 65-566.

En la Tabla 6 se muestran los datos del cristal y del refinamiento de la estructura. Las distancias de los enlaces y los ángulos en el piroglutamato pueden apreciarse en la Tabla 7.

Los valores en general concuerdan con los reportados para el ácido piroglutámico¹⁴ y como es de esperarse las mayores diferencias surgen como consecuencia de la desprotonación del grupo -COOH formando el grupo carboxilato, en el que las distancias del enlace C-O tienden a igualarse por deslocalización del enlace π al unirse al centro metálico (la longitud del enlace C-O es de 1,250(2) y 1,254(2) Å comparado con d(C-OH) = 1,319(1) Å y d(C=O) = 1,219(1) Å para el ácido piroglutámico).

Tabla 6. Datos de los cristales y resultados del refinamiento estructural para [Mg(DL-pGlu)₂].

Fórmula empírica	C ₁₀ H ₁₂ MgN ₂ O ₆
Peso Molecular	280,53
Temperatura (K)	297(2) K
Longitud de onda (Å)	1,54184 Å
Sistema Cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C2/c
Dimensiones de Celda Unidad	a = 13,0724(5) Å b = 10,0554(3) Å c = 8,0843(2) Å β = 90,005(3)°
Volumen	1062,66(6) Å ³
Z, densidad (calculada)	4, 1,753 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	1,764 mm ⁻¹
F(000)	584
Dimensiones del cristal (mm ³)	0,219 x 0,167 x 0,131 mm ³
Rango- θ en recolección de datos	5,472 to 71,881°
Rangos de índices de Miller	$\leq h \leq 15$, $-12 \leq k \leq 12$, $-9 \leq l \leq 6$
Reflexiones recolectadas	1871
Reflexiones independientes	1029 [R(int) = 0.0190]
Reflexiones observadas [$I > 2\sigma(I)$]	1021
Compleitud (%) hasta $\theta = 67.684^\circ$	99,9 %
Corrección de absorción	Semi-empíricos a partir de equivalentes
Max. y min. transmisión	1.000 and 0.911
Método de refinamiento	Cuadrados mínimos matriz completa en F ²
Datos/restricciones/parámetros	1029/0/112
Bondad de ajuste en F ²	1,048
Índices R finales ^a [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0,0310, wR2 = 0,0760
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0312, wR2 = 0,0762
Mayor diferencia pico y hueco (e.Å ⁻³)	0,221 y -0,221 e.Å ⁻³

$$^a R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|, wR_2 = [\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2 / \sum w(|F_o|^2)^2]^{1/2}$$

¹⁴ M.K Panda, T. Runcevski, A. Husain, R.E Dinnebier, P. Naumov. *J Am Chem Soc.* **2015.** 137, 1895-1902.

Tabla 7. Distancias [Å] y ángulos de enlace [°], para el piroglutamato en [Mg(DL-pGlu)₂].

C(1)-O(1)	1,250(2)
C(1)-O(2)	1,254(2)
C(1)-C(2)	1,529(2)
C(2)-N	1,458(2)
C(2)-C(3)	1,535(2)
C(3)-C(4)	1,529(2)
C(4)-C(5)	1,514(2)
C(5)-O(3)	1,240(2)
C(5)-N	1,330(2)
O(1)-C(1)-O(2)	125,6(1)
O(1)-C(1)-C(2)	117,2(1)
O(2)-C(1)-C(2)	117,1(1)
N-C(2)-C(1)	111,0(1)
N-C(2)-C(3)	102,8(1)
C(1)-C(2)-C(3)	116,3(1)
C(4)-C(3)-C(2)	104,6(1)
C(5)-C(4)-C(3)	104,2(1)
O(3)-C(5)-N	125,8(1)
O(3)-C(5)-C(4)	126,0(1)
N-C(5)-C(4)	108,2(1)
C(5)-N-C(2)	115,1(1)

Las distancias y los ángulos de los enlaces de coordinación alrededor del metal se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] del metal en [Mg(DL-pGlu)₂].

Mg-O(1)	2,085(1)
Mg-O(2)#1	2,075(1)
Mg-O(3)#4	2,114(1)
O(2)#1-Mg-O(2)#2	87,97(6)
O(2)#1-Mg-O(1)	93,91(4)
O(2)#2, 3-Mg-O(1)	92,09(5)
O(1)-Mg-O(3)#4	89,64(5)
O(2)#1-Mg-O(3)#5	90,27(5)
O(1)-Mg-O(3)#5	84,54(5)
O(3)#4-Mg-O(3)#5	91,69(7)
O(1)-Mg-O(1)#3	171,66(7)
O(2)#1-Mg-O(3)#4	176,09(4)

Transformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes: (#1) -x+1, -y+1, -z+1; (#2) x, -y+1, z+1/2; (#3) -x+1, y, -z+3/2; (#4) x, y, z+1; (#5) -x+1, y, -z+1/2

El ion Mg(II) está ubicado en un doble eje cristalográfico con un entorno octaédrico, coordinado por los átomos de oxígeno carboxílicos (distancias de enlace Mg-O 2,085(1) y 2,075(1) Å) y un oxígeno carbonílico [d(Mg-O)= 2,114(1) Å] con seis ligandos vecinos relacionados simétricamente. Cuatro de estos poseen la misma quiralidad y los otros dos son estereoisómeros racémicos (centro estereogénico en el átomo α -carbono C2; Figura 6). Los ángulos de enlace trans O-Mg-O en el núcleo de MgO₆ son 171,66 (7) y 176,09 (4) ° y los ángulos cis O-Mg-O están en el rango de 84,54 (5) -93,91 (4).°. Los octaedros del MgO₆ vecinos están relacionados a través de una operación de simetría del plano que da lugar a una estructura extendida en cadena a lo largo del “eje c” y el cual se estabiliza aún más por un enlace intermolecular entre el NH...O que involucra como aceptor a un átomo de oxígeno carboxílico [d(NH...O)=2,09(3) Å, \angle (NH... O)=147(3) °].

Estas cadenas, a su vez, están dispuestas en capas eléctricamente neutras paralelas al plano (100). Las capas vecinas están unidas ligeramente entre sí, lo que favorece el “twinning” observado en una rotación de 180° alrededor del eje a*. Un entorno octaédrico similar alrededor del metal se reportó para otro piroglutamato Ca(L-pGlu)₂ (grupo espacial ortorrómbico P2₁2₁2, Z=4), donde las moléculas de L-pGlu actúan como un ligando puente a través de carboxilato y un ligando monodentado a través del átomo de oxígeno como donador de la función amida¹⁵. Sin embargo, allí los dos ligandos de L-pGlu por cada Ca(II) son cristalográficamente no equivalentes, el metal se encuentra en el cristal en una posición general y las distancias de enlace Ca-O, están en un rango más largo (2,281(1)-2,398(1) Å) que la longitud de los enlaces Mg-O reportados en este trabajo debido a que el radio iónico del Ca(II) es mucho mayor que el del ion Mg(II).

3.2.2.1. Resultados y discusión del patrón de difracción de rayos X en polvo(PXRD)

No hace falta decir que a pesar del “twinning” de los cristales discutido anteriormente, la problemática de la recolección de datos de un solo cristal, la solución de la estructura y el refinamiento no afectaron los datos de PXRD. La Figura 7 compara el patrón de difracción de rayos X de la muestra en forma de polvo microcristalino de Mg(DL-pGlu)₂ con el calculado a partir del cristal. La Figura 7 muestra que el material en su estado de agregación policristalino tiene la misma estructura cristalina que su contraparte sin una contribución significativa de impurezas, por lo que sirve como una referencia útil para confirmar rápidamente la identidad y la pureza de cualquier muestra en polvo de Mg(DL-pGlu)₂. Se pueden observar picos de difracción del polvo en un único valor (en grados) de 11,13; 13,58; 15,60; 17,64; 22,22; 24,86; 27,30; 31,50; 35,41 y 40,57, con un error estimado de $\pm 0,03^\circ$.

¹⁵ H. Schmidbaur, P. Kiprof, O. Kumberger, J. Riede. *J Chem Ber.* **1991.** 124, 1083-1087.

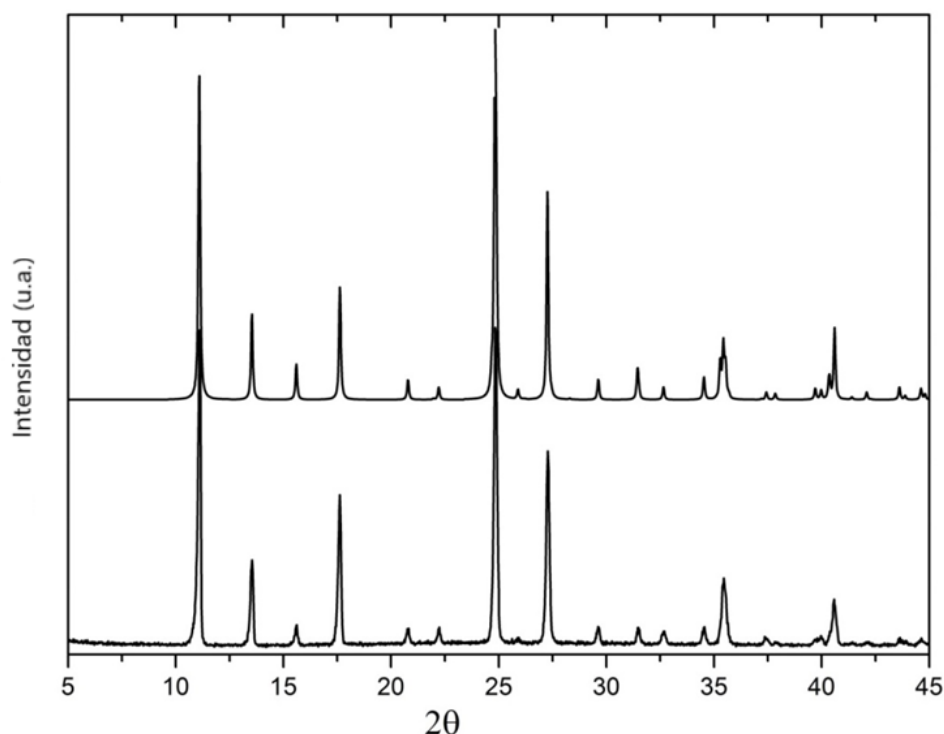


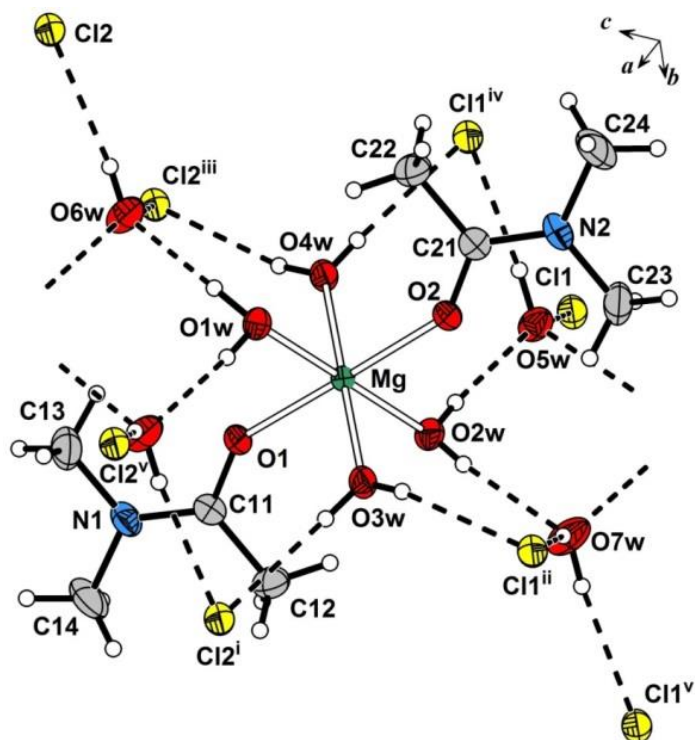
Figura 7. Trazas inferior: patrón experimental de difracción de rayos X en polvo (PXRD) del Mg(DL-pGlu)_2 recopilado con radiación $\text{CuK}\alpha$. Trazas superior: patrón de PXRD calculado a partir de la estructura molecular en estado sólido del cristal.

3.2.3. Cristalografía por rayos X del complejo $[\text{Mg(DMA)}_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

La Figura 8 muestra el ORTEP¹⁶ dibujado para el complejo. En la Tabla 9 se muestran los datos del cristal y del refinamiento estructural obtenidos mediante difracción por rayos X. Las distancias y los ángulos de enlace alrededor del metal se presentan en la Tabla 10. El catión Mg(II) se encuentra en un entorno octaédrico casi perfecto (MgO_6), en el plano ecuatorial coordina por cuatro moléculas de agua [la distancia del enlace Mg-Ow : 2,055(2) hasta 2,100(2) Å] y axialmente por dos oxígenos carbonílicos que provienen de dos ligandos de DMA [distancia de enlace Mg-O : 2,041(2) y 2,042(2) Å]. Los ángulos de enlace *trans* O-Mg-O están en el rango de 179,12(7) a 179,50(9)° y los ángulos *cis* O-Mg-O se encuentran en el intervalo de 87,29(9)-92,83(7)°. Los ligandos de DMA están coplanares entre sí (con un ángulo de 4,1(2)°), y perpendiculares al plano ecuatorial (ángulo diedro de 85,02(5)°) e inclinados con respecto plano de coordinación axial en 32,91(5)°.

¹⁶ L.J Farrugia. *J Appl Cryst.* **1997.** 30, 565-566.

(A)



(B)

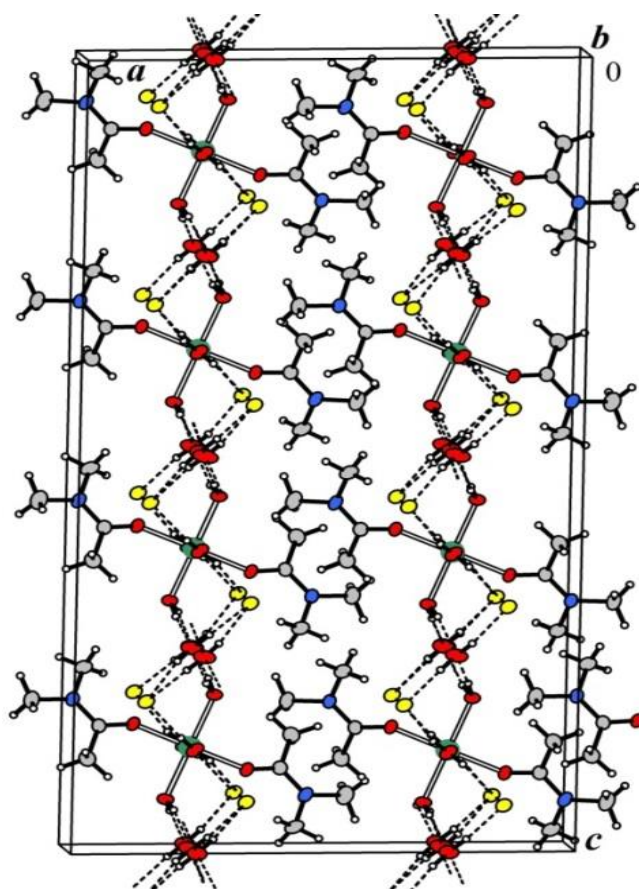


Figura 8. (A) Vista de la estructura cristalina de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. En colores se detallan los distintos átomos. Mg (verde oscuro), Oxígeno (rojo), hidrógeno (blanco), carbono (gris), nitrógeno (celeste), cloro (amarillo). (B) vista del empaquetamiento del cristal con el eje *b* que muestra la estructura en capas paralelas al plano.

Tabla 9. Datos de los cristales y resultados del refinamiento estructural
[Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂·2H₂O.

=====	
Fórmula empírica	C ₈ H ₃₀ Cl ₂ MgN ₂ O ₈
Peso molecular	377,55
Temperatura	297(2) K
Longitud de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	I 2/a
Dimensiones de celda unidad	a = 16,4182(8) Å b = 8,0355(4) Å c = 29,573(2) Å β = 91,376(5)°
Volumen	3900,4(3) Å ³
Z	8
Densidad (calculada)	1,286 Mg/m ³
Coeficiente de absorción	0,396 mm ⁻¹
F(000)	1616
Dimensiones del cristal	0,386 x 0,253 x 0,244 mm ³
Rango θ en recolección de datos	3,154 a 28,868°
Rangos de índices	-21 ≤ h ≤ 21, -10 ≤ k ≤ 8, -36 ≤ l ≤ 40
Reflexiones recolectadas	9693
Reflexiones independientes	4282 [R(int) = 0,0276]
Reflexiones observadas [I > 2σ(I)]	2191
Compleitud hasta θ = 25.242°	99,7 %
Método de refinamiento	Cuadrados mínimos matriz complete en F ²
Datos/restricciones/parámetros	4282/1/245
Bondad de ajuste en F ²	1,002
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0,0473, wR2 = 0,1299
Índices R (todos los datos)	R1 = 0,0927, wR2 = 0,1689
Mayor diferencia pico y hueco	0,271 y -0.308 e.Å ⁻³
=====	

$$^a R_1 = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|, wR_2 = [\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2 / \sum w(|F_o|^2)^2]^{1/2}$$

Tabla 10. Distancias [Å] y ángulos de enlace [°] en torno al metal
en [Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂·2H₂O.

Mg-O(1)	2,041(2)
Mg-O(2)	2,042(2)
Mg-O(1W)	2,097(2)
Mg-O(2W)	2,100(2)
Mg-O(3W)	2,055(2)
Mg-O(4W)	2,058(2)
O(1)-Mg-O(2)	179,12(7)
O(1)-Mg-O(3W)	90,44(8)
O(2)-Mg-O(3W)	90,30(8)
O(1)-Mg-O(4W)	89,41(8)
O(2)-Mg-O(4W)	89,86(8)
O(3W)-Mg-O(4W)	179,3(1)
O(1)-Mg-O(1W)	87,29(9)
O(2)-Mg-O(1W)	92,23(9)
O(3W)-Mg-O(1W)	89,81(8)
O(4W)-Mg-O(1W)	90,84(8)
O(1)-Mg-O(2W)	92,83(9)
O(2)-Mg-O(2W)	87,66(9)
O(3W)-Mg-O(2W)	89,70(9)
O(4W)-Mg-O(2W)	89,65(9)
O(1W)-Mg-O(2W)	179,50(9)

El cristal está dispuesto en capas eléctricamente neutras $a/2$ paralelas al plano (100). Las capas vecinas están relacionadas simétricamente por planos de deslizamiento espejados entre sí a lo largo del eje a y conectados entre sí a través de los ligandos intercalados de DMA (ver Figura 8). El cristal se estabiliza aún más por una capa interna rica en enlaces de H dados por la presencia de las moléculas de agua (ver Figura 8). Estas se pueden agrupar en dos grupos; el primero está conformado por las aguas de coordinación (w1-w4) y estas moléculas actúan como donores en los enlaces OwH. En estos enlaces las aguas w1 y w2 están unidas por puente H a las moléculas de agua del otro grupo que actúan como aceptores (la distancia de enlace OwH ... Ow es de 1,90 (4) a 2,04 (3) Å y los ángulos de enlace Ow-H...Ow están en el rango 165 (3) -176 (3) °). Las aguas w3 y w4 se unen por los H a los iones cloruro (las distancias OwH ... Cl van desde 2,34 (3) a 2,43 (3) Å y los ángulos de Ow-H ... están en el rango 166 (2) -175 (3) °).

El segundo grupo está compuesto por tres moléculas de agua de cristalización (w5-w7), los oxígenos O5w y O7w están ubicados cristalográficamente en dos ejes plegables. Estas moléculas de agua de cristalización actúan también como donantes en enlaces OwH ... Cl (distancias de enlace OwH ... Cl van desde 2,25 (3) a 2,36 (3) Å y el ángulo para Ow-H ... Cl está en el rango de 171 (3) -174 (3)°). El resto de los enlaces OwH...A se describen en la Tabla 11 se detalla las distancias y ángulos de enlace.

Cabe mencionar que si bien hay tres aguas de cristalización cristalográficamente diferentes (w5, w6 y w7), w5 y w7 están sobre sendos ejes dobles y w6 en una posición general del cristal, por lo que w5 y w7 tienen una ocupación 1/2 comparada con la ocupación completa de w6. Así es que, en la fórmula química aparece un total neto de 2 moléculas de H₂O por fórmula.

Tabla 11. Distancias de H [Å] y ángulos [°] de enlace para [Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂.2H₂O.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	∠(D-H...A)
O(1W)-H(1A)...O(6W)#1	0,77(3)	2,06(3)	2,821(3)	172(3)
O(1W)-H(1B)...O(6W)	0,90(4)	1,90(4)	2,789(3)	176(3)
O(2W)-H(2A)...O(5W)	0,77(3)	2,02(4)	2,791(3)	174(4)
O(2W)-H(2B)...O(7W)	0,79(3)	2,04(3)	2,814(3)	165(3)
O(3W)-H(3A)...Cl(2)#1	0,82(3)	2,34(3)	3,161(2)	175(3)
O(3W)-H(3B)...Cl(1)#2	0,74(3)	2,43(3)	3,153(2)	168(3)
O(4W)-H(4A)...Cl(2)#3	0,83(3)	2,35(3)	3,155(2)	166(2)
O(4W)-H(4B)...Cl(1)#4	0,77(3)	2,42(3)	3,181(2)	175(3)
O(5W)-H(5)...Cl(1)	0,91(3)	2,25(3)	3,154(2)	174(3)
O(6W)-H(6A)...Cl(2)#3	0,89(3)	2,29(3)	3,182(2)	173(3)
O(6W)-H(6B)...Cl(2)	0,82(3)	2,34(4)	3,155(2)	171(3)
O(7W)-H(7)...Cl(1)#5	0,83(3)	2,36(3)	3,183(2)	172(3)

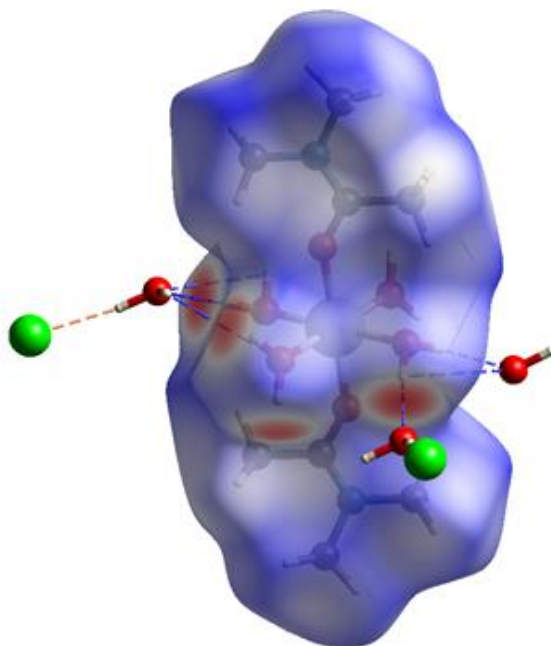
Trasformaciones de simetría utilizadas para generar átomos equivalentes: (#1) $-x+1/2, -y+3/2, -z+3/2$; (#2) $-x+1/2, y+1, -z+1$; (#3) $-x+1/2, -y+1/2, -z+3/2$; (#4) $-x+1/2, y, -z+1$; (#5) $x, y+1, z$.

3.2.3.1. Estudio de las interacciones intermoleculares por análisis de Hirshfeld (HSs)

Los datos cristalográficos obtenidos de la Tabla 11 fueron utilizados para ser analizados por HSs. En la Figura 9 se describen los contactos cercanos entre los átomos donores y los átomos aceptores en el enlace de hidrógeno. Los contactos con mayor densidad electrónica se pueden ver como áreas circulares de color rojo en la superficie del d_{norm} (ver sección 7.13.1) que están asociados con los hidrógenos que pertenecen a moléculas de agua coordinadas con átomos de oxígeno de las moléculas de agua de cristalización. Estas interacciones direccionales de enlace de hidrógeno (H (adentro)... O (afuera) junto con el hidrógeno-cloro (H (adentro)Cl (afuera)) contribuyen en un 8,6% y 10,8% de la superficie total de Hirshfeld con dos picos en el gráfico de huellas digitales 2D (Figura 9B y C). Los contactos no direccionales H... ..H se caracterizan por ser picos más anchos (Figura 9D).

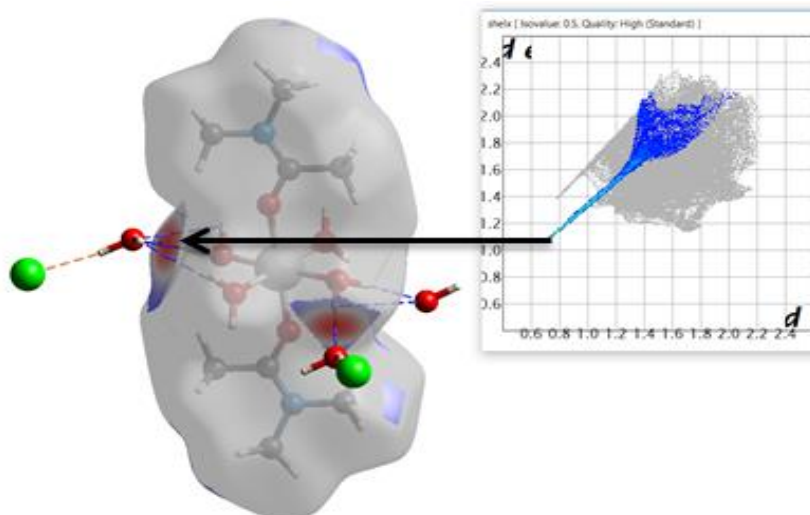
Se sabe que la resistencia que existe dentro de la red cristalina puede ser estimada de acuerdo con los contactos cercanos H ... H. Usualmente, el porcentaje del área de Hirshfeld con los contactos H..H es mayor que los otros contactos debido al volumen atómico más pequeño del hidrógeno¹⁷. En este cristal, la contribución es del 73,1% con pocos contactos con distancias inferiores a 2,32 Å (<suma de radios atómicos) y más contactos con distancias superiores a 2,57 Å. Por lo tanto, y basado en la bibliografía de la temática, se esperaba un punto de fusión bajo para el complejo de magnesio. La determinación del mismo dio como resultado un punto de fusión de $95 \pm 0,1$ °C valor que está de acuerdo¹⁷ con lo esperado.

(A)

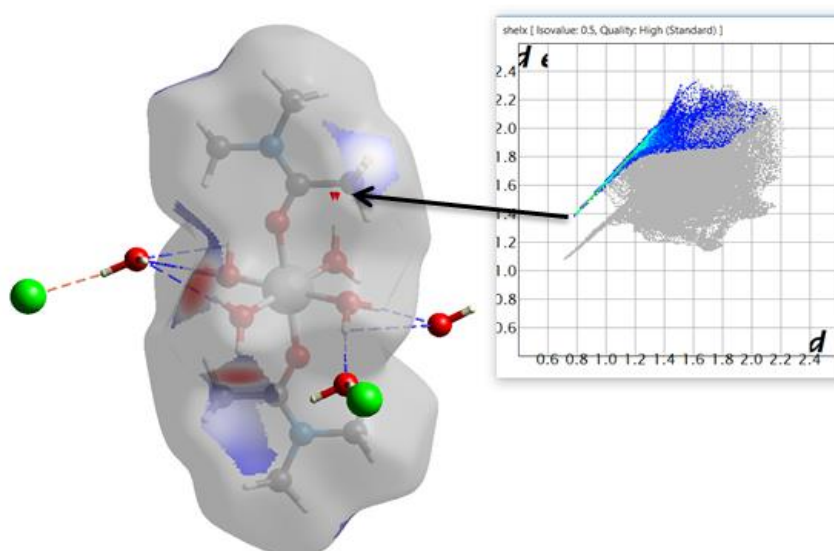


¹⁷ S. Grabowsky, P.M Dean, B.W Skelton, A.N Sobolev, M.A Spackmana, A.H White. *Cryst Eng Comm.* **2012.** 14, 1083-1093.

(B)



(C)



(D)

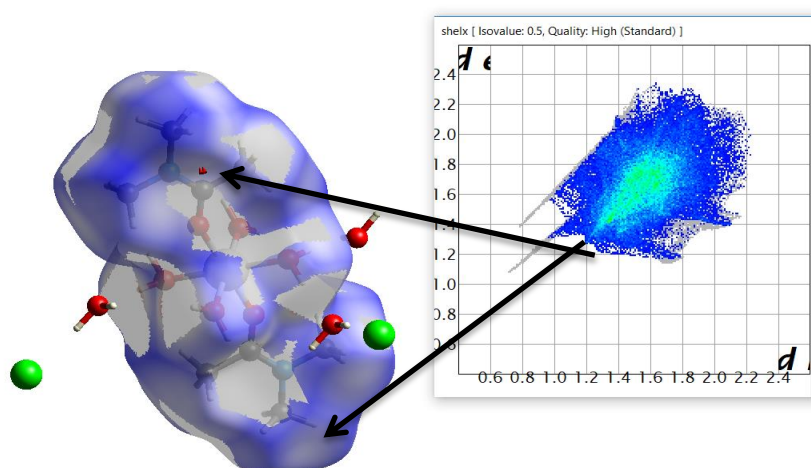


Figura 9. Mapas de superficies de Hirshfeld con d_{norm} . (A) curva 2D de huellas digitales de (B) H.....O, (C) H. . .Cl, (D) H....H.

3.3. Espectroscopía Vibracional (Espectroscopía Infrarrojo (FTIR) y Raman)

3.3.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

En una primera instancia de la caracterización fisicoquímica se estudian los espectros FTIR y Raman de los nuevos complejos derivados de sertralina. El espectro infrarrojo de hidrocloreto de sertralina (sertralina) ha sido estudiado ampliamente por nuestro grupo de trabajo y las asignaciones realizadas en el espectro experimental fueron cotejadas en simultáneo por cálculos teóricos^{18,19}

Por ese motivo, se discutirán entonces los cambios más remarcables que se producen en los nuevos complejos en comparación con las asignaciones realizadas para sertralina.

Tanto sertralina como los complejos en estudio presentan grupos NH_2^+ y en consecuencia se espera la aparición de dos bandas correspondientes a las frecuencias de estiramiento simétrico y antisimétrico relacionadas al mismo.

En general, el modo de estiramiento antisimétrico se presenta a mayores valores de frecuencia ($3420\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) que el correspondiente al modo de estiramiento simétrico ($3340\text{-}3420\text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, la formación de puentes H intermoleculares entre los átomos de H provenientes del grupo NH_2^+ del catión SerH_2^+ (donores) y los átomos de cloro del anión CuCl_4^{2-} (sección difracción de rayos X) afectan notablemente la posición de dichas bandas causando un corrimiento hacia menores valores de frecuencias.

En la Figura 10 se muestran de forma comparativa los espectros de infrarrojo de sertralina (SerH_2Cl) y los complejos derivados con cobre: $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$. En ellos se pueden observar para la forma hidratada las bandas correspondientes a las frecuencias de estiramiento N-H simétrica y asimétrica en 2457 cm^{-1} (ν_{as}) y 2371 cm^{-1} (ν_{s}) y en 2450 cm^{-1} y 2368 cm^{-1} en el espectro de la forma no hidratada.

¹⁸ G.E Escudero, V. Ferraresi Curotto, C.H Laino, R. Pis Diez, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc.* **2013.** 104, 271-279.

¹⁹ G.E Escudero, C.H Laino, N. Martini, G.A Echeverría, O.E Piro, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Ann Med Chem Res.* **2017.** 3, 1017.

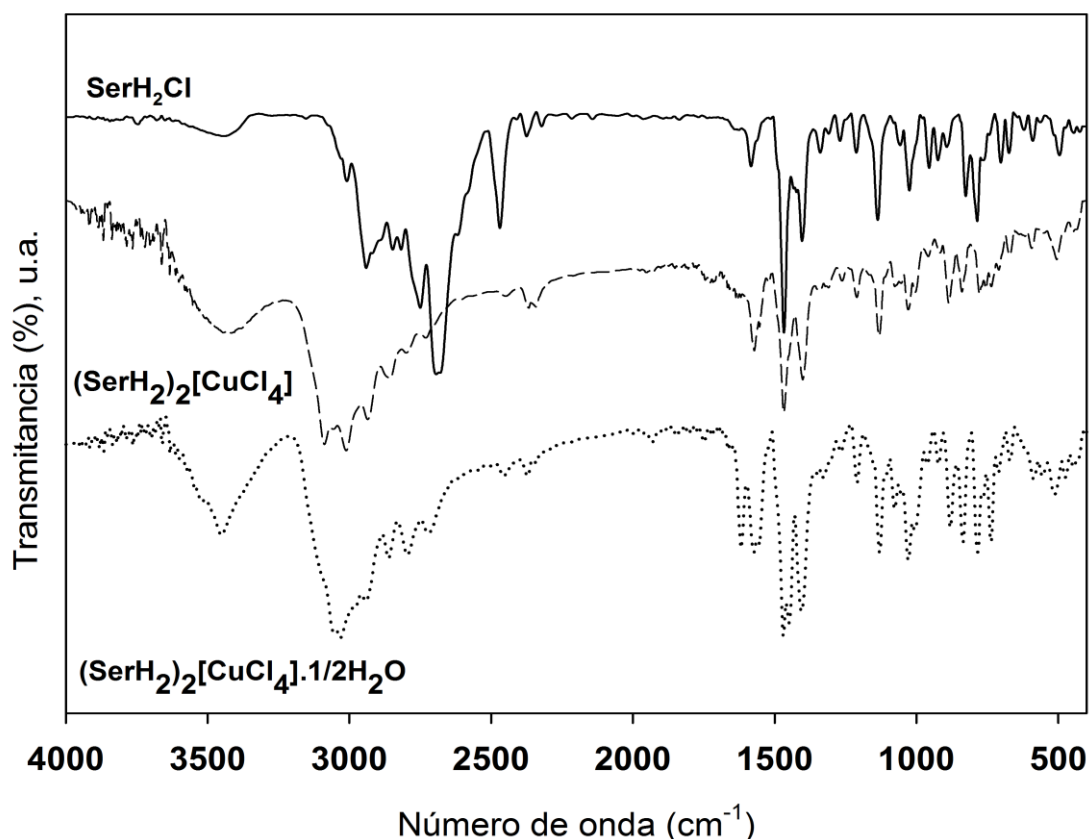


Figura 10. Espectros de infrarrojo de sertralina (SerH_2Cl) y los complejos derivados con cobre: $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.

Varios autores han estudiado la naturaleza de los enlaces de hidrógeno, dando lugar a controversias en las asignaciones de las frecuencias de vibración del estiramiento de NH_2^+ . Existen en la bibliografía trabajos como los Chenon y Sandorfy²⁰, Heacock y Marion²¹, y Giffin y colaboradores²², entre otros, en donde se describió que las bandas de estiramiento de los grupos amino protonados pueden ser localizadas entre 2800 cm^{-1} y 2400 cm^{-1} . Incluso, algunos de estos autores llegaron a la conclusión que los enlaces de hidrógeno de los átomos de hidrógeno amino (NH-X) causan un cambio regular de dichas frecuencias hacia números de onda inferiores al aumentar el tamaño de aniones ($\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$).

Para complementar la información anterior se realizaron mediciones de Raman (Figura 11) que nos permiten asignar los modos vibracionales asociados con el cloro. Así, para el enlace C-Cl, el modo de estiramiento $\nu(\text{C-Cl})$ se observa en 481 cm^{-1} en el espectro FTIR y en 483 cm^{-1} en el espectro Raman. Además dos de los modos de vibración esperados para la especie CuCl_4^{2-} se localizan en 306 cm^{-1} y 240 cm^{-1} en el espectro Raman.

Otra ventaja de usar la espectroscopía Raman fue la asignación de la banda de absorción del agua que aparece a 1620 cm^{-1} en el espectro FTIR que se hizo casi apenas visible en el espectro Raman como era de esperar.

²⁰ B. Chenon, C. Sandorfy. *Canadian J Chem.* **1958**. 36(8), 1181-1206.

²¹ R.A Heacock, L. Marion. *Canadian J Chem.* **1956**. 34(12), 1782-1795.

²² G.A Giffin, S. Boesch, D.N Bopege, D.R Powell, R.A Wheeler, R. Frech. *J Phys Chem B.* **2009**. 113(49), 15914-15920.

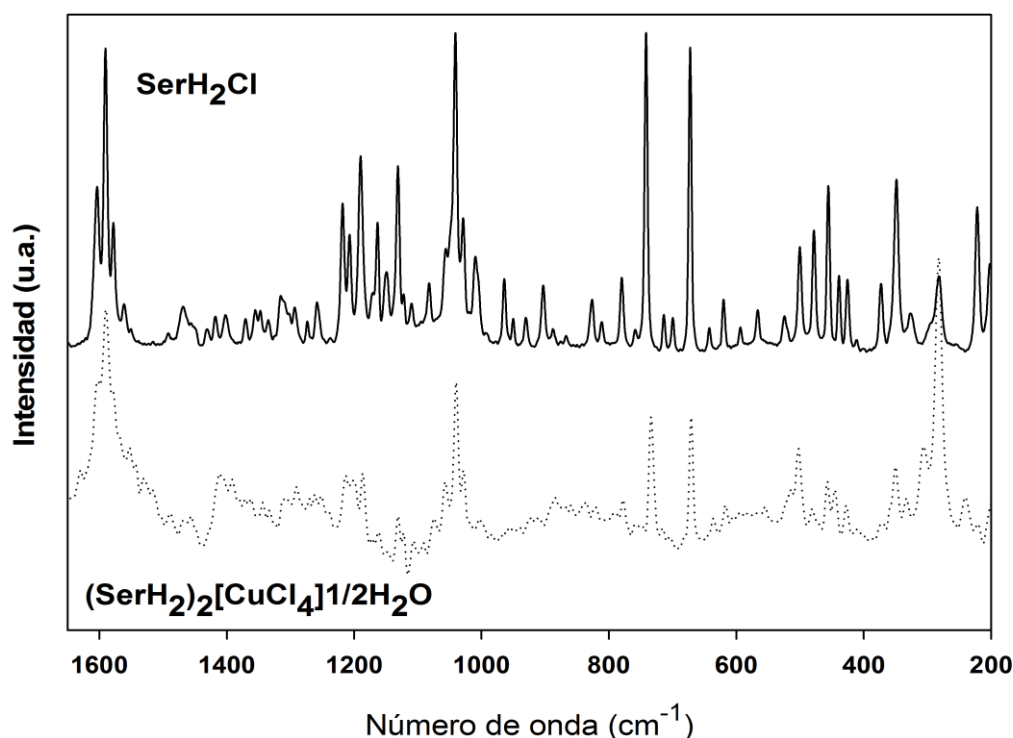


Figura 11. Espectros Raman de sertralina (SerH_2Cl) y de la forma hidratada $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$.

3.3.2. Derivados de metimidazol y Cu(II) $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4](3)$

La asignación de los espectros de infrarrojo permite la asignación tentativa de las bandas más características de los complejos sintetizados. En particular se presta una especial atención a las bandas de absorción de las tioamidas.

El ligando, metimidazol refleja un gran interés en la química de coordinación porque es una tiona heterocíclica y por lo tanto presenta la posibilidad de manifestar tautomerismo tiona-tiol, en su molécula. Esta propiedad lo ha convertido en un potencial ligando bidentado.

La forma “tionea” $\text{C}=\text{S}$ es la que predomina en el estado sólido. En cambio en solución, existen varias causas que pueden afectar dicho equilibrio, entre las que más se conocen son: la naturaleza del ión metálico, el tipo de solvente y el pH²³. La prevalencia de la forma tionea en el sólido, es confirmada por la ausencia de la banda correspondiente al estiramiento $\nu(\text{SH})$ en 2500 cm^{-1} y la presencia de la banda relacionada al estiramiento $\nu(\text{NH})$ ²⁴ en 3100 cm^{-1} .

En primer lugar, se consideran las bandas características más significativas de los ligandos y su posición en el espectro cuando estos están coordinados. Las

²³ E.S Raper. W. Clegg. *Inorg Chim Acta*. **1991**. 180, 239-244.

²⁴ E.S Raper. *Coord Chem Rev*. **1997**. 165, 475-567.

bandas de las tioamidas se emplean para predecir el modo de coordinación en complejos heterocíclicos de tionas^{25,26}.

El grupo tioamida, presenta una serie de bandas fundamentales que involucran los enlaces N-C y C=S, y que pueden usarse como indicadores de la estructura electrónica alrededor de estos enlaces.

Desseyn y Herman^{27,28} asignaron las siguientes bandas:

1. Banda fuerte **Tioamida I**, alrededor de 1570-1395 cm^{-1} , debida a los modos de tensión $\nu(\text{C-N})$.
2. Banda **Tioamida II**, alrededor de 1420-1260 cm^{-1} , debida a los modos $\delta(\text{N-H})$ interactuando con $\nu(\text{C-N})$ y $\nu(\text{C=S})$.
3. Banda **Tioamida III**, alrededor de 1140-940 cm^{-1} , atribuible a una vibración compuesta que supone un cierto carácter de $\nu(\text{C=S})$.
4. Banda **Tioamida IV**, asignada a los modos $\nu(\text{C=S})$, que es debida al carácter parcial de doble enlace del carbono azufre y que aparece en torno a 800-700 cm^{-1} .

A continuación se presentan las asignaciones de las bandas más importantes obtenidas de forma experimental (Tabla 12) para los espectros infrarrojos de los complejos $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2) comparándolos con el espectro vibracional de los ligandos. El denominado complejo (3) es similar al (2) en cuanto a la asignación de bandas a excepción de la correspondiente a la del agua que se menciona más abajo. Los espectros de FTIR de los tres complejos se muestran en la Figura 12. El ligando disulfuro fue sintetizado de acuerdo al procedimiento seguido por Johnson y colaboradores²⁹ y fue comparado con el metimidazol. Estudiando las diferencias de las bandas relacionadas a los modos vibracionales característicos de ambos ligandos y comparándolos con el de los complejos, se pudieron extraer las siguientes observaciones:

²⁵ E.S Raper. *Coord Chem Rev.* **1985**. 61, 115-184.

²⁶ N.A Bell, W. Clegg, S.J Coles, C.P Constable, R.W Harrington, M.B Hursthouse, M.E Light, E.S Raper, C. Sammon, M.R Walker. *Inorg Chim Acta.* **2004**. 357, 2091-2099.

²⁷ H.O Desseyn, M.A Herman. *Spectrochim Acta Part A Mol Spectrosc.* **1967**. 23, 2457-2463.

²⁸ J. Jolley, W.I Cross, R.G Pritchard, C.A McAuliffe, K.B Nolan. *Inorg Chim Acta.* **2000**. 315, 36-43.

²⁹ T.B Johnson, C.O Edens. *J Am Chem Soc.* **1942**. 64, 2706-2708.

Tabla 12. Bandas de FTIR características para el metimidazol, disulfuro de metimidazol, $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.

Metimidazol	Metimidazol disulfuro	$[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ Azul	$[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$ Verde	Asignaciones
		enmascarada	1598 (d)	$\delta\text{H}_2\text{O}$
1570(f)	1586(m)	1527(m)	1533 (m)	$\nu(\text{C}=\text{C})+\nu(\text{C}-\text{N})$
1462(f)	1455(f)	1457(f)	1497 (m)	Tioamida I $\nu(\text{C}-\text{N})+\delta(\text{C}-\text{H})$
1271(f) 1245(m)	1266(f)	1281(f)	1284 (f)	Tioamida II $(\text{C}-\text{N})+\delta(\text{C}-\text{H})+\nu(\text{C}-\text{S})$
			1128(f)	$\nu_3\text{SO}_4^{2-}$
1084(m)	1073(m)	1089(d)	1085(d)	Tioamida III $\nu(\text{C}-\text{N})+\nu(\text{C}-\text{S})$
			962(m)	$\nu_1\text{SO}_4^{2-}$
766(m) 740(m)	766(f)	747(m)	768(m)	Tioamida IV $\nu(\text{C}-\text{S})$
			664(m)	$\nu_4\text{SO}_4^{2-}$
	513(d), 481(d)	498(d), 467(d)		$\nu(\text{S}-\text{S})$

f=fuerte, m=media, d=débil

El ligando disulfuro muestra las bandas ubicadas en 513 cm^{-1} y 481 cm^{-1} en el espectro las cuales no aparecen en el metimidazol y que son las que se esperan en el rango para las bandas típicas del $\nu(\text{S}-\text{S})$. Esas bandas pueden visualizarse en el complejo(1) en 498 y 467 cm^{-1} lo que refuerza la idea de la presencia del puente disulfuro en el complejo. Esos cambios se correlacionan con cambios en la densidad electrónica debidos a la coordinación y formación de anillos quelatos^{30,31}.

También es posible destacar que las bandas que se conocen para las tioamidas (I) y (II) poseen una baja contribución C-S y la mayor contribución se origina principalmente en el modo de deformación para el enlace C-N. Este cambio significativo es observado en la banda de la tioamida(II) (Tabla12) la cual se mueve a frecuencias más altas sugiriendo que hay una coordinación M-N^{32,33}.

³⁰ K.G Allum, J.A Creighton, J.H.S Green, G.J Minkoff, L.J.S Prence. *Spectrochim Acta*. **1968**. 24, 927-941.

³¹ M.M Kadooka, L.G Warner, K. Seff. *J Am Chem Soc*. **1976**. 98, 7569-7568.

³² N.A Bell, W. Clegg, S.J Coles, C.P Constable, R.W Harrington, M.B Hursthouse, M.E Light, E.S Raper, C. Sammon, M.R Walker. *Inorg Chim Acta*. **2004**. 357, 2091-2099.

³³ J. Jolley, W.I Cross, R.G Pritchard, C.A McAuliffe, K.B Nolan. *Inorg Chim Acta*. **2000**. 315, 36-43.

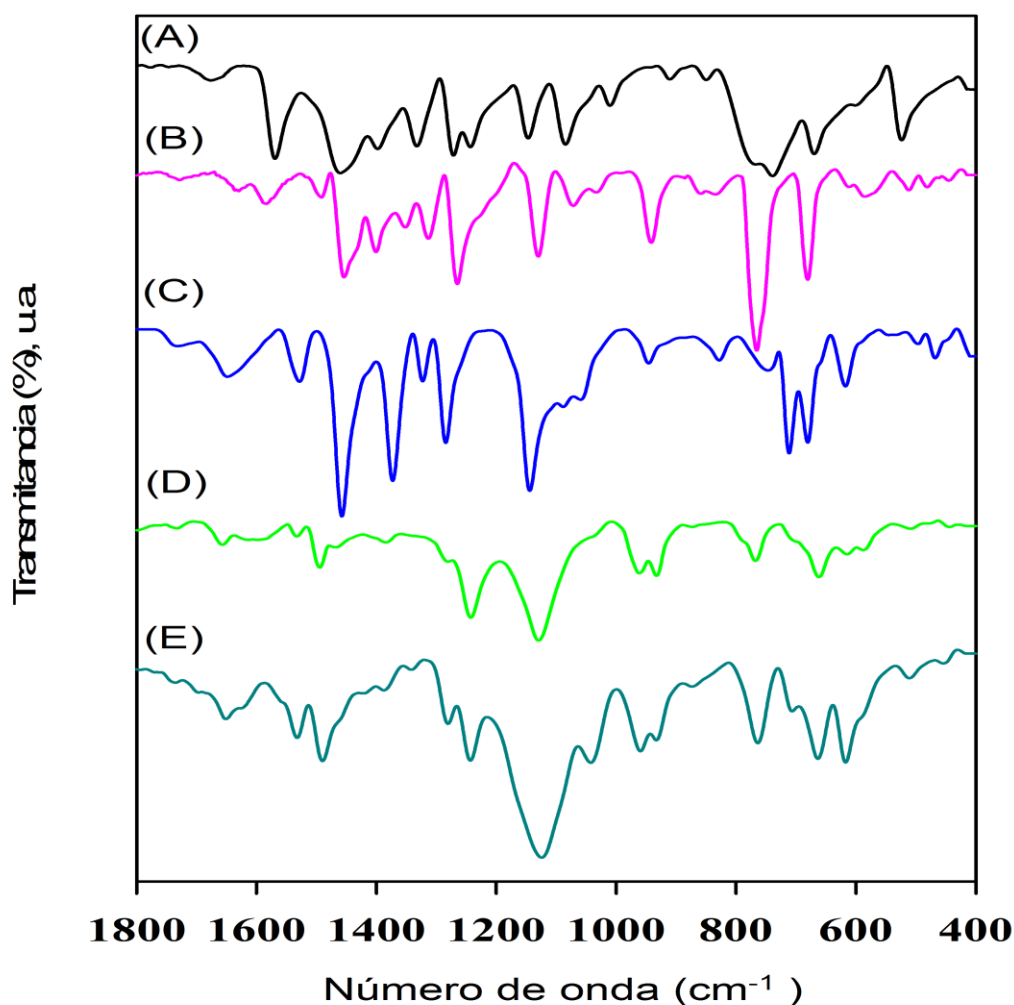


Figura 12. Espectros FTIR de **(A)** metimidazol, **(B)** disulfuro de metimidazol, **(C)** $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, **(D)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ y **(E)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]$.

Los espectros de FTIR de los complejos (2) y (3) son similares entre sí. En ambos compuestos, las bandas correspondientes al anión sulfato coordinado de forma bidentada se presentan en³⁴: $\nu_3 = 1128 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_1 = 962 \text{ cm}^{-1}$ y $\nu_4 = 664 \text{ cm}^{-1}$.

Para el complejo(1) el haluro³⁵ terminal puede ser detectado por la aparición de la banda característica en el espectro Raman en 186 cm^{-1} (no se muestra).

El espectro FTIR obtenido para el complejo(3) (producto parcial de la descomposición del complejo(2)), es muy similar al obtenido para el complejo(2) sin la banda típica $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ asignada al modo de flexión de la molécula de agua (Figura 12).

³⁴ K. Nakamoto. *Part A theory and applications in inorganic chemistry*. 6th edn. Wiley, Hoboken. **2009**.

³⁵ J.R Creighton, D.J Gardiner, A.C Gorvin, C. Guttridge, A.R.W Jackson, E.S Raper, P.M.A Sherwood. *Inorg Chim Acta*. **1985**. 103, 195-205.

3.3.3. Derivado del ácido DL-pGlu y Mg(II): [Mg(DL-pGlu)₂]

La caracterización complementaria del complejo en estado sólido se realizó por espectroscopía FTIR y Raman. Las asignaciones y la discusión comparativa de los espectros se realizaron en base a datos estructurales y espectroscópicos previos de los ácidos L-pGlu y DL-pGlu^{36,37}.

Las asignación de las bandas de mayor relevancia obtenidas con el FTIR y el Raman del complejo en estado sólido y del ligando, se presentan en la Tabla 13.

Se observan diferentes cambios (Figuras 14 y 15). Como es de esperar hay tres bandas típicas relacionadas con el estiramiento del grupo OH (derivados de puente de hidrógeno en el sólido del ácido DL-pGlu) y se localizan en 2824 cm⁻¹, 2726 cm⁻¹ y 1970 cm⁻¹ en el espectro FTIR. Estas bandas desaparecen cuando se produce coordinación del ligando con el átomo de magnesio.

Tabla 13. Asignaciones tentativas del espectro vibracional FTIR y Raman del ácido DL-piroglutámico (DL-pGlu) y Mg(DL-pGlu)₂. Valores en cm⁻¹.

Ácido DL-pGlu		Mg(DL-pGlu) ₂		Asignaciones
FTIR	Raman	FTIR	Raman	
3308(f)		3283(f)		v(N-H)
1957(m)				Puente H
1722(f), 1713(h)	1715(h), 1705(m)			v(C=O) _{carboxílico}
1627(f, a)	1598(m)	1659(f)	1660(f)	v(C=O) _{amida}
		1590(f)	1593(m)	v _{as} (COO ⁻)
1464(m)	1470(m)			δ(CH ₂)
		1451(f)	1451(f)	v _s (COO ⁻)
1439(m)	1440(m)	1435(h), 1424(m)	1428(m), 1427(m)	δ(OH) δ(NH)
1418(m)	1418(m)	1385(d), 1361(m)	1349(d)	δ(CH ₂)
1238(m, a)	1247(m)	1260(f)	1246(m)	v(C-O)
1011(m)	1016(m)	1020(m)	1023(m)	v _{anillo}
976(m)	979(m)	982(m)	986(m)	v _{anillo}
878(m)	885(f)	894(m)	896(m)	v _{anillo}
733(m)	741(d)	725(m)	723(m)	γ(C=O)
705(m)	687(m)	668(d)		γ(NH)

(f) fuerte, (d) débil, (m) medio, (h) hombro, (a) ancha.

³⁶ J. Archer. *Anim Behav.* **1973**. 21, 205-235.

³⁷ M. Vitores-Lozano, A-M. Bellocq. *J Chim Phys.* **1973**. 70, 1337-1344.

El ligando contiene una amida secundaria con el grupo NH y, en consecuencia, sólo se observa un enlace H y una sola banda en el espectro FTIR a 3308 cm^{-1} . Esta banda y el grupo funcional carbonilo están conjugados y, por esa razón, el estiramiento $\nu(\text{C}=\text{O})$ aparece a frecuencias más bajas (1627 cm^{-1} , FTIR; 1598 cm^{-1} , Raman)³⁸ (Figuras 14 y 15). En el complejo de magnesio, la conjugación se rompe porque el grupo carbonilo se coordina con el centro metálico. Tras la coordinación, el enlace $\text{C}=\text{O}$ se acorta ($1,24\text{ Å}$) en comparación con el ligando ($1,25\text{ Å}$) y, por lo tanto, la frecuencia de la banda correspondiente se desplaza hacia mayores frecuencias (1658 cm^{-1} IR, 1660 cm^{-1} Raman).

En el ligando en estado sólido, la banda de estiramiento del $\text{C}=\text{O}$ del ácido carboxílico aparece como una banda intensa en 1722 cm^{-1} (FTIR) y un hombro a 1715 cm^{-1} (Raman) en concordancia con una distancia más corta ($1,219\text{ Å}$) y en comparación con la distancia del enlace $\text{C}=\text{O}$ en el grupo amida³⁹. Durante la formación del complejo y la desprotonación, esta banda desaparece y surgen dos nuevas bandas que corresponden al estiramiento antisimétrico y simétrico $\nu(\text{COO}^-)$ del grupo carboxilato, que se detectan en las bandas del FTIR del complejo a 1590 cm^{-1} y 1451 cm^{-1} . El modo de estiramiento $\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$ aparece a frecuencias más bajas que $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{O})$ mientras que el $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$ aparece a mayores frecuencias, cuando son comparadas con el modo $\nu(\text{C}-\text{O}(\text{H}))$ del ácido DL-pGlu⁴⁰. Esto se deduce ya que las distancias del enlace $\text{C}-\text{O}$ en el complejo ($1,25$ y $1,254\text{ Å}$) son intermedias entre las distancia del grupo $\text{C}-\text{O}$ y el $\text{C}-\text{O}(\text{H})$ ($1,219$ y $1,319\text{ Å}$) en el ácido DL-pGlu. Esto coincide con las mediciones de distancias de enlace realizadas por la técnica de difracción de rayos X.

Estas bandas fueron asignadas en comparación con el espectro del Raman en el cual la banda correspondiente al modo de estiramiento antisimétrico se observa con menor intensidad como era de esperar (1590 cm^{-1}) y la banda correspondiente al modo de estiramiento simétrico aparece como una nueva banda de fuerte intensidad a 1450 cm^{-1} .

Es conocido que el valor $\Delta\nu [\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)-\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)]$ es usado para inferir cuál sería el modo de coordinación del carboxilato. De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, se presentan los siguientes modos de coordinación⁴¹ que se observan en la Figura 13.



Figura 13. Modos de coordinación para el anión carboxilato a un sitio metálico⁴⁰

³⁸ B. Smith .CRC Press: F.L Boca Raton. **1999**.

³⁹ J. Archer. *Anim Behav.* **1973**. 21, 205-235.

⁴⁰ D. Lin-Vien, N.B Colthup, W.G Fately, J.D Grasselli. *Academic Press: Boston*.**1991**.

⁴¹ K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds (3rd edn)*.**1978**.

De acuerdo entonces al $\Delta\nu$ estimado se puede sugerir el modo de coordinación.

Para la forma de coordinación (I) el $\Delta\nu$ es en general mucho más grande que el correspondiente a la forma iónica. Para (II), el valor de $\Delta\nu$ es significativamente menor que el correspondiente a la forma iónica. Para (III), el $\Delta\nu$ es mayor que para la forma quelato o bidentada y cercano a los valores para la forma iónica.

En este complejo, el grupo carboxilato está coordinado formando un puente con dos iones de Mg(II) y el valor $\Delta\nu$ calculado 130 cm^{-1} lo que coincide con el modo de coordinación propuesto y observado en la estructura cristalina⁴⁰.

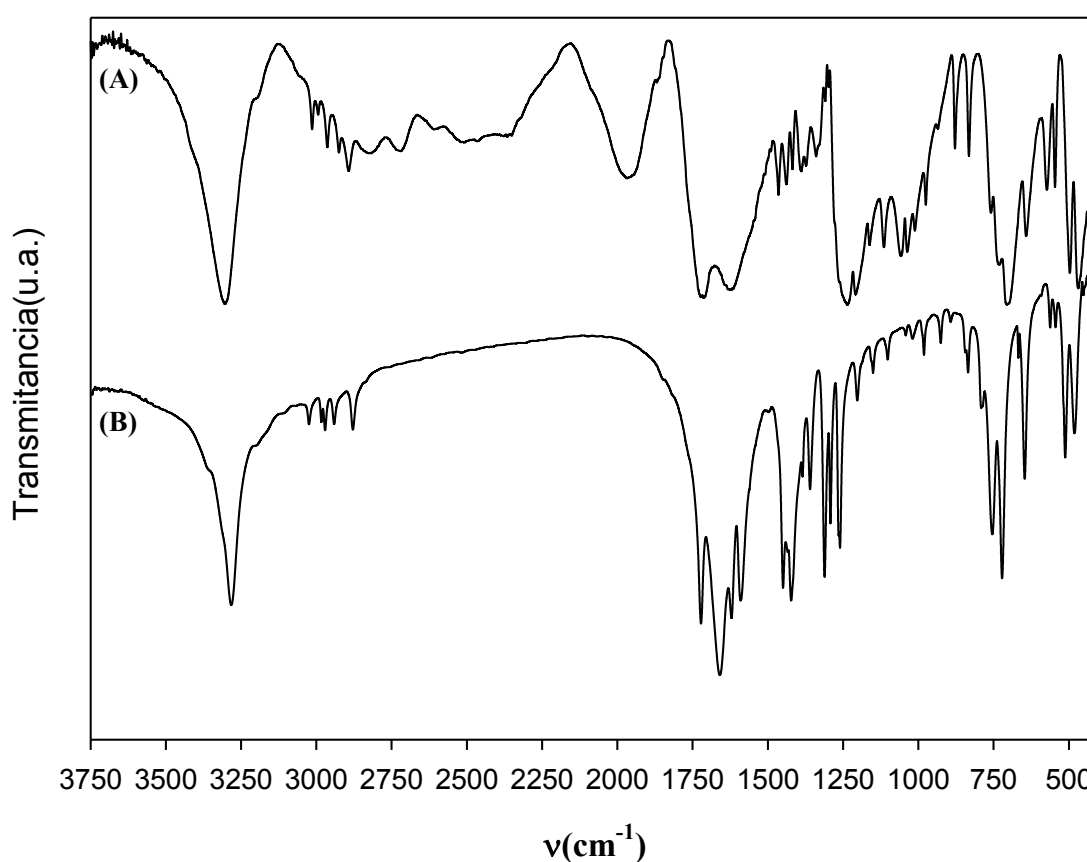


Figura 14. Espectros FTIR de **(A)** ácido DL-pGlu y **(B)** $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.

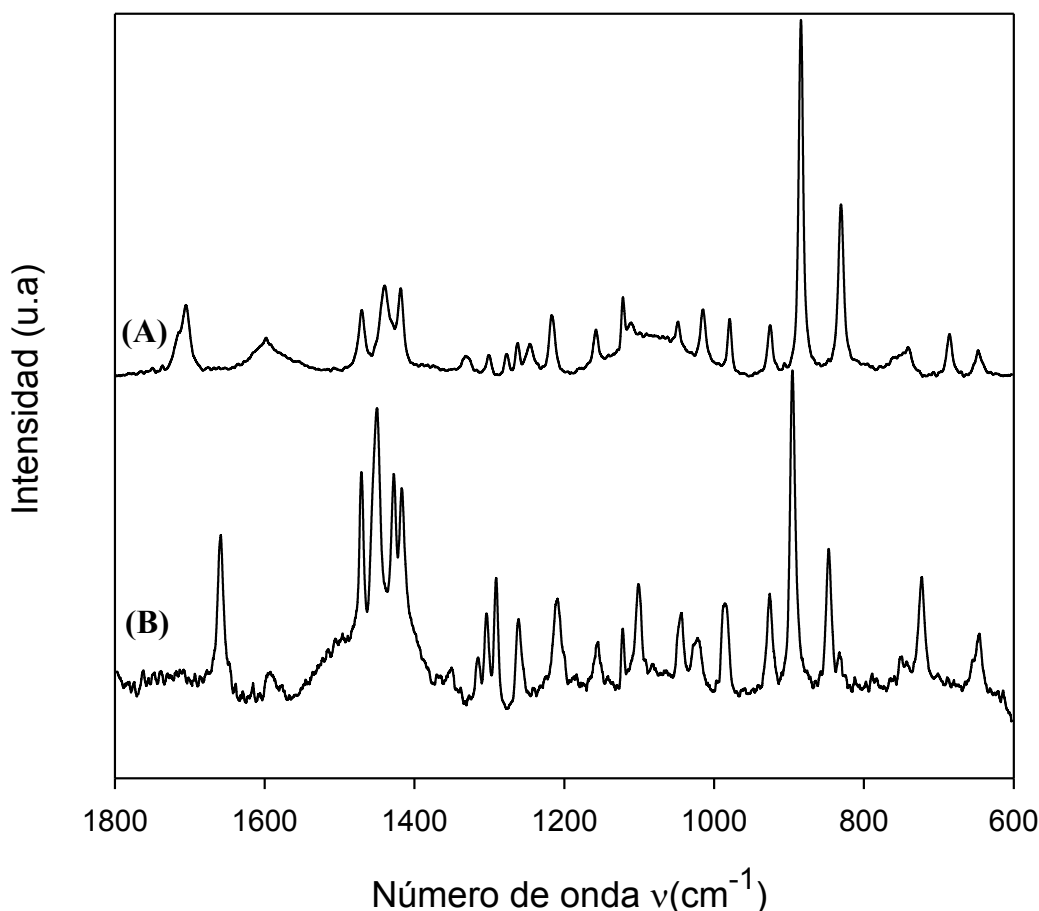


Figura 15. Espectros Raman de **(A)** ácido DL-pGlu y **(B)** Mg(DL-pGlu)₂.

3.3.4. Derivado de la N,N-dimetilacetamida y Mg(II)

Los espectros FTIR y Raman del complejo de magnesio fueron analizados por comparación con el ligando libre, y las asignaciones de los modos vibracionales fueron respaldados por el espectro FTIR simulado a partir de cálculos DFT computacionales, (ver Tabla 14).

Los espectros teóricos y experimentales del complejo [Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂·2H₂O se pueden ver en la Figura 16 en la misma puede observarse que existe una coincidencia razonable del espectro experimental y el teórico sin la necesidad de utilizar factores de ajuste.

El espectro vibracional para la N,N-dimetilacetamida ha sido ampliamente estudiado⁴². Las bandas características para la DMA se ubican a 1652 cm⁻¹, esta asignación corresponde a las contribuciones de las vibraciones de los enlaces $\nu\text{C=O}$ y νCN . La estructura de la DMA fue ampliamente descrita, se sabe que puede describirse como un híbrido de resonancia (ver Figura 17).

⁴² G. Durgaprasad, D.N Sathyanarayana, C.C Patel. *Spectrochim Acta*. **1972**. 28, 2311-1318.

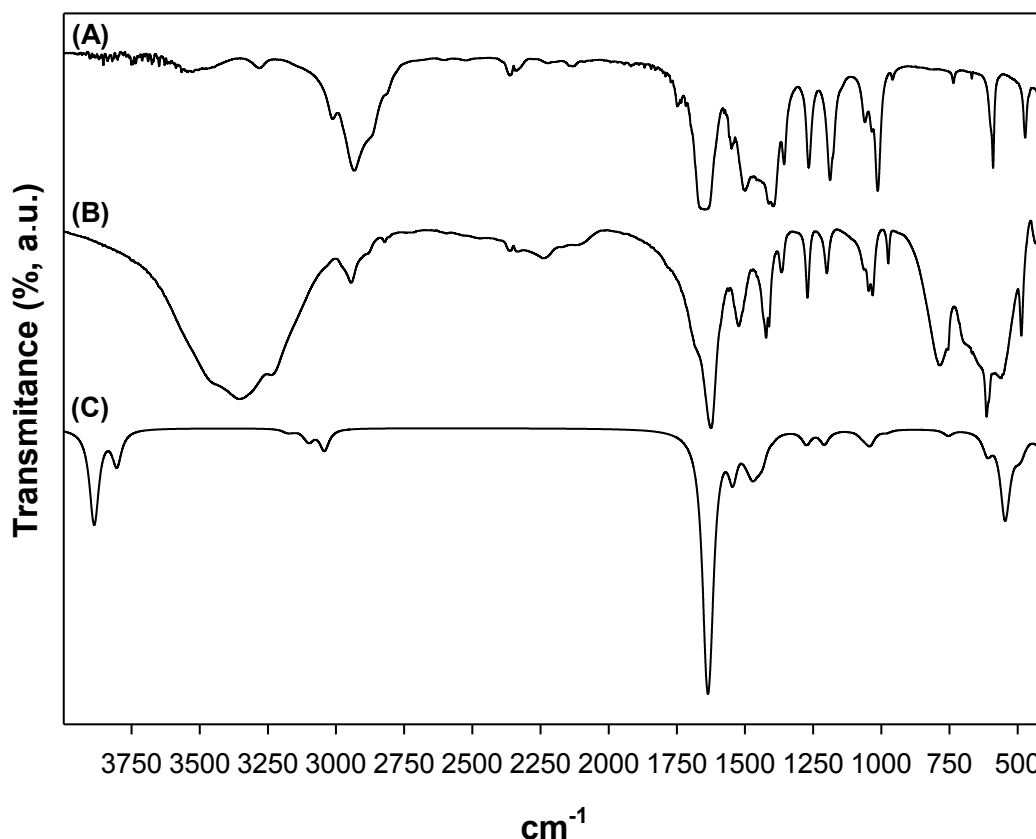


Figura 16. Espectros FTIR experimentales: **(A)** DMA, **(B)** $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y calculado **(C)** $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

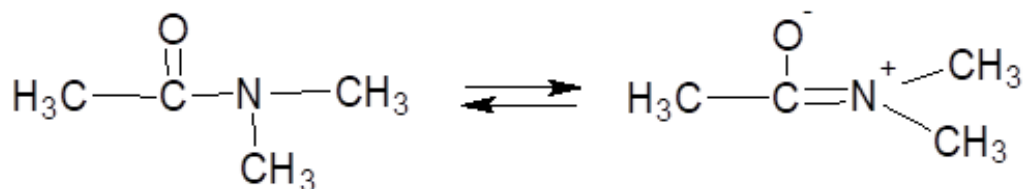


Figura 17. Estructuras resonantes de la DMA

La forma híbrida cargada es la que aparece coordinando al magnesio en el complejo, $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 8 y 17) y como es de esperarse se observa una disminución en el orden de enlace de la banda $\nu\text{C}=\text{O}$ y por otro lado un incremento en el de la νCN por lo que las bandas se desplazan a 1626 cm^{-1} y 1524 cm^{-1} , respectivamente (Tabla 14, Figura 16). Los otros cambios que se observan en los espectros luego de la coordinación son en las bandas del ligando ubicadas a 1265 cm^{-1} y 1190 cm^{-1} los que pertenecen a los modos de estiramientos asimétricos del enlace νCN y se produce la combinación de los modos vibracionales de estiramiento νCC y balanceo de NCH_3 , los que se mueven a las zonas de mayor frecuencia y se ubican a 1272 y 1200 cm^{-1} , respectivamente.

Tabla 14. Asignaciones vibracionales tentativas del espectro FTIR y Raman experimental y calculado.

DMA Raman	FTIR	Asignaciones	[Mg(DMA) ₂ (H ₂ O) ₄]Cl ₂ ·3H ₂ O				Asignaciones
			Raman	FTIR	PED(%)		
				Exp.	Calc.		
			3812(m) 3608(m)	3450(f)	3892	s5(100)	v _{as} (OH)
					3887	s1(100)	
					3885	s3(99)	
					3884	s7(100)	
			3353(m)	3355(f, a)	3809	s6(98)	v _s (OH)
					3803	s2(93)s8(92)	
					3801	s4(91)	
	3282(d)		3181(m)	3244(f, a)	3185	s17(92)	v _{as} (CH) ((CH ₃)N)
					3182	s24(90)	
					3178	s14(89)	
					3169	s21(86)	
					3165	s18(92)s20(13)	
					3157	s9(84)s11(15)	
					3116	s19(95)	
					3114	s10(98)	
					3110	s22(86)	
					3103	s12(90)	
					3099	s25(92)	
					3095	s15(95)	
3018(d) 2932(m) 2867(d) 2814(d) 2781(d)	3010(m) 2935(f) 2875(h) 2815(d)	v _{as} (CH ₃)N v _s (CH ₃)N v _{as} (CH ₃)C v _s (CH ₃)C	2981(h) 2943(m)	2970(h) 2947(m) 2885(h) 2823(d)	3053	s11(84)s9(15)	v _s (CH) ((CH ₃)N)
					3052	s20(84)s18(12)	
					3045	s26(87)	
					3044	s16(86)	
					3040	s23(81)	
					3039	s13(85)	
1656(h) 1637(m)	1652(f, a)	νC=O+νC-N	1650(md) 1631(md)	1682(h) 1626(f)	1653	s47(44)s28(16)	δ(OH ₂)+ν(C-O)
					1642	s27(18)s45(13) s47(16)s49(31)	ν(C-O)+δ(OH ₂)
					1638	s45(68)	δ(OH ₂)
					1631	s43(75)s49(11)	δ(OH ₂)
					1628	s49(39)s43(17) s27(16)	δ(OH ₂)+ν(C-O)
					1623	s47(35)s28(18)	δ(OH ₂)+ν(C-O)
	1550(d)			1524(f)	1546	s29(19)s28(16) s93(11)s55(10)	ν(CC)+ν(C-O)+ τ(HCCN)+δ(CH ₂)
		1544	s34(21)s28(18) s62(23)s66(10)		ν(NC)+ν(C-O)+δ(CH ₂)		
1497(m)	1501(f)	δ(N)CH ₃ + τ(N)CH ₃ , νC-N+ νCO			1503	s59(61)s105(10)	δ(CH ₂)+τ(HCNC)
					1501	s67(57)s109(12)s65(10)	δ(CH ₂)+τ(HCNC)
					1499	S57(69)	δ(CH ₂)
					1496	s55(59)	δ(CH ₂)
					1491	s66(61)	δ(CH ₂)
					1490	s58(68)s92(10)	δ(CH ₂)+τ(HCCN)
					1480	s64(62)s107(13)	δ(CH ₂)+τ(HCNC)
					1478	s54(58)	δ(CH ₂)
					1475	s65(56)	δ(CH ₂)
					1472	s56(66)s92(10)	δ(CH ₂)+τ(HCCN)
					1465	s50(57)s96(10)	δ(CH ₂)
1452(m)	1460(m)	δ(CH ₃)C + δN(CH ₃)	1456(d)		1463	s61(63)s106(12)	δ(CH ₂)+τ(HCCN)
					1450	s52(57)s62(56) s34(13)s29(12)	δ(CH ₂)+ν(NC)+ν(CC)
					1437	s63(77)	δ(CH ₂)
			1427(m)	1425(m)	1434	s53(86)	δ(CH ₂)
1413(f)	1412(f)	δ(CH ₃)N	1413(h)	1413(m)	1399	s60(87)	δ(CH ₂)
1398(m) 1358(m)	1397(m) 1358(f)	δ(CH ₃)C	1364(m)	1367(f)	1397	s51(83)	δ(CH ₂)
1327(d)	1265(f)	νC-N		1272(f)	1277	s35(43)s109(14)	ν(NC)+τ(HCNC)
1267(d)			1271(d)		1273	s33(42)s70(10)s99(10)	ν(NC)+ν(CC)+δ(NCO)+ τ(HCCN)
					1208	s93(42)s99(11)	τ(HCCN)

1188(m)	1190(f)	$\nu_{CC} + \delta_{N(CH_3)}$		1200(f)	1209	s102(38)s32(12)	$\tau(HCCN) + \nu(CC)$
					1208	s93(42)s99(11)	$\tau(HCCN)$
					1169	s97(68)	$\tau(HCNC)$
					1165	s105(65)	$\tau(HCCN)$
1109(d)					1119	s98(67)s107(66) s64(12)s58(12)	$\delta(CH_2) + \tau(HCNC)$
			1086(m)		1074	s109(41)s35(18) s67(14)	$\tau(HCNC) + \nu(NC) + \delta(CH_2)$
1065(d)	1060(m)	$\tau_{N(CH_3)}$		1064(m)	1071	s99(34)s33(19) s96(12)s57(11)	$\tau(HCCN) + \nu(NC) + \delta(CH_2)$
					1060	s101(55)s122(16)	$\tau(HCNC) + \gamma(CNOC) + \delta(CH_2)$
					1056	S92(53)s120(19)s56(11)	$\tau(HCCN) + \gamma(CNOC) + \delta(CH_2)$
	1034(h)	$\tau_{CCH_3} + \tau(N)CH_3$	1044(m)	1047(m)	1044	s106(48)s61(13)s34(11)	$\tau(HCCN) + \delta(CH_2) + \nu(NC)$
1013(m)	1013(f)	τ_{CCH_3}		1032(m)	1039	s96(47)s50(14)	$\tau(HCCN) + \delta(CH_2)$
					982	s32(56)s102(11)	$\nu(CC) + \tau(HCCN)$
961(m)	960(d)	$\nu_{CC} + \nu_{NC} + \tau_{N(CH_3)}$	981(m)	975(m)	978	s31(56)	$\nu(CC)$
737(f)	736(d)	$\nu_{CC} + \nu_{NC}$	754(mf)	789 (f)	755	s30(66)	$\nu(CC)$
					753	s36(83)	$\nu(CC)$
	670(d)			676(m)			
591(d)	591(f)	$\delta_{OCN} + \nu_{NC}$	610(m)	614(f)	614	s122(30)s71(20)	$\gamma(CNOC) + \delta(NCO)$
			591(m)		609	s122(24)s70(20)	$\gamma(CNOC) + \delta(NCO)$
			570(m)		605	S120(33)s71(12)	$\gamma(CNOC) + \delta(NCO)$
					604	s120(17)s71(13) s70(12)	$\gamma(CNOC) + \delta(NCO)$
				565(m)	548	s48(59)s42(10)	$\delta(HOMg)$
			521(d)		536	s42(70)	$\delta(HOMg)$
					503	s44(75)s59(61) s105(10)	$\delta(HOMg) + \tau(HCNC)$
472(d)	474 (m)	$\delta_{CNC} + \delta_{OCC}$	488(d)	488(m)	490	S46(66)s58(12) s48(11)s92(10)	$\delta(HOMg) + \delta(CH_2) + \tau(HCCN)$
					483	s73(32)s75(15)s72(12)	$\delta(CCN) + \delta(CNC) + \delta(CCO)$
					476	s72(36)s77(14)	$\delta(CCO) + \delta(CNC)$
422 (d)		δ_{CNC}	436(d)	420(d)	425	s75(50)	$\delta(CNC)$
					419	s77(58)	$\delta(CNC)$
			311(d)		323	S90(61)s87(49)s85(14)	$\tau(HOMg)$
					315	s85(21)s39(14)	$\tau(HOMgO) + \nu(MgO)$
					291	s91(43)s40(22)	$\tau(HOMgO) + \nu(MgO)$
					285	s40(51)s91(10)s88(10)	$\tau(HOMgO) + \nu(MgO)$
			266(d)		275	s123(48)s95(19)	$\tau(HCNC) + \tau(CNC O)$
			231(d)		232	s90(61)	$\tau(HOMg)$
			171(d)		176	s94(33)s114(19) s120(11)s88(10)	$\tau(HCCN) + \tau(CNC O) + \gamma(CNOC) + \tau(HOMgO)$
					170	S115(40)s103(18)	$\tau(CNCC) + \tau(HCCN)$

En contraste con el ligando, el conjunto de bandas del complejo ubicadas en la región de 1065-1030 cm^{-1} poseen contribuciones de los modos vibracionales correspondientes a los grupos HCNC, NC y CNOC. Por otro lado, la banda sensible localizada a 591 cm^{-1} en la DMA, que fue asignada al modo vibracional de la flexión del grupo OCN, aparece a mayores frecuencias en el

complejo metálico (614 cm^{-1}). La banda localizada a 565 cm^{-1} corresponde exclusivamente al complejo y fue asignada al modo vibracional del δHOMg .

La presencia de agua es observada en la región de $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ y se caracteriza por ser una banda ancha e intensa asociada al estiramiento νOH . También puede observarse a $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$ el modo vibracional de δOH_2 (Figura 16, Tabla 14).

3.4. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR)

La resonancia paramagnética electrónica es una técnica espectroscópica sensible a la presencia de electrones desapareados en iones y moléculas. En ese sentido es ideal para estudiar por ejemplo al catión cobre(II) (d^9) o al catión oxidovanadio(IV) (d^1). Los datos experimentales que resultan de un espectro de EPR son las componentes del tensor giromagnético (g) y la constante de acoplamiento hiperfino (A), que permiten deducir la simetría del entorno sobre el sitio magnético, el estado fundamental del ion metálico, el grado de deslocalización electrónica así como también la naturaleza de los ligandos.

A partir del valor del tensor se puede conocer el entorno en que se encuentra el electrón desapareado y la distorsión con respecto a la geometría regular prevista. En los espectros axiales los factores g (que se refieren a los ejes principales del sistema paramagnético: $g_{||}$ ó g_{\perp} , siendo $g_{iso} = 1/3 (g_{||} + 2g_{\perp})$) son diferentes dependiendo de que el término fundamental sea $d_{x^2-y^2}$ ó d_{z^2} . En el primer caso, $g_{||} > g_{\perp} > 2,00$ y en el segundo caso $g_{||} > g_{\perp} = 2,00$.

Los dos espectros axiales elongado y comprimido son claramente reconocibles y pueden ser usados como criterio para distinguir un estado fundamental $d_{x^2-y^2}$ y d_{z^2} , respectivamente, de acuerdo a los valores numéricos del tensor. De estos espectros también se obtiene la constante de acoplamiento hiperfino ($A_{||}$ y A_{\perp} , $A_{iso} = 1/3 (A_{||} + 2A_{\perp})$). Este término es esencial para interpretar los átomos que componen la esfera de coordinación del ion metálico central.

Para una distorsión rómbica se observan tres valores de g : g_z (g_1), g_x (g_2), g_y (g_3), donde $g_{iso} = 1/3 (g_1 + g_2 + g_3)$ y de la constante de acoplamiento hiperfino: A_z , A_x y A_y . Por esos motivos, se convierte en una técnica relevante para el estudio del entorno de coordinación de los complejos metálicos tanto en estado sólido como en solución. Sobre la base de estos conceptos, a partir de los parámetros de EPR fueron propuestas las geometrías y las esferas de coordinación para cada uno de los complejos en estudio, las que presentan muy buena correlación con los datos espectroscópicos de infrarrojo y de reflectancia UV-visible.

3.4.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

Se realizaron los espectros de resonancia paramagnética EPR en banda X y Q en las muestras sólidas. Cabe mencionar que ambos complejos muestran señales de EPR similares y por tanto se discute el de la especie hidratada. Los

resultados se muestran en la Figura 18. Como puede observarse, el espectro se muestra cuasi axial. Ninguna de las dos determinaciones, ni el espectro en banda X (Figura 18A) ni el de banda Q (con mayor definición, (Figura 18B) presentan una estructura hiperfina típica para los centros de Cu(II) que deriva de la interacción del spin del electrón desapareado con el núcleo de Cu(II) ($I = 3/2$). La simulación del espectro permite determinar los parámetros del tensor g siendo $g_{\parallel} = g_z = 2,410$ y $g_x = g_y = g_{\perp} = 2,120$ con un valor de $g_{iso} = 2,217$.

Con el objetivo de observar el comportamiento de la muestra hidratada, se midieron los espectros EPR (banda X) en el rango de 290-5K. Como puede verse en la Figura 18C, al principio, la señal de EPR a temperatura ambiente mostraba una forma de línea típica de un espectro tipo isotrópico. Sin embargo, a medida que la temperatura disminuye, la línea se estrecha y, como resultado, la intensidad del espectro aumenta. El espectro EPR resultante (banda X, 10K) se puede ver en la Figura 18C. Este cambio en los espectros EPR a baja temperatura podría sugerir una disminución en el efecto Jahn-Teller. Los parámetros del tensor g , obtenidos del proceso de simulación para este espectro de EPR, concuerdan con los tipos de señales rómbicas que son $g_z = 2,265$, $g_x = 2,075$, $g_y = 2,190$ ($g_{iso} = 2,176$).

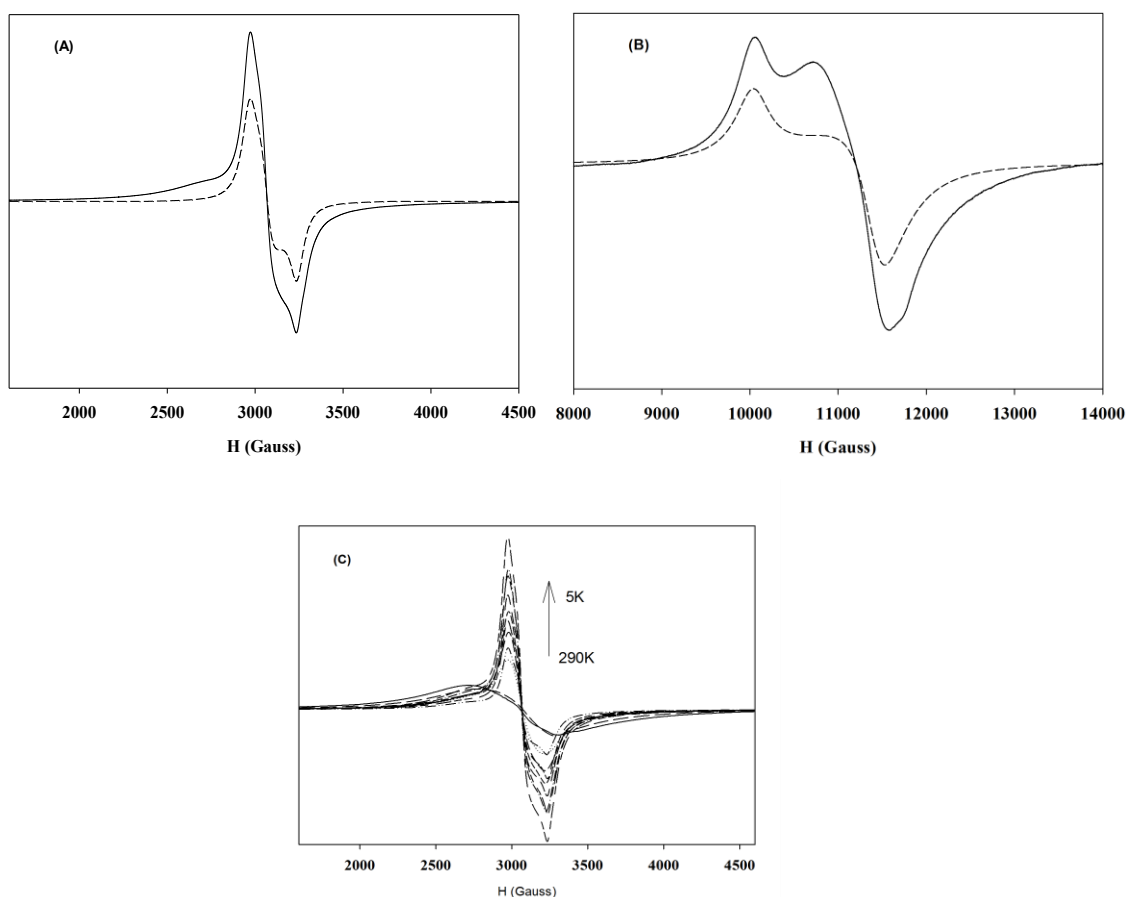


Figura 18. (A) Espectro EPR experimental (línea sólida) y calculado (línea discontinua) para la muestra policristalina del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, medida en banda X (290K, 9,79 GHz). (B) Espectro EPR experimental (línea sólida) y calculado (línea discontinua) para la muestra policristalina del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$, medida en banda Q (290K, 33,9 GHz). (C) Dependencia de la temperatura del espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) medida en banda X del complejo de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (de 290K a 5K).

Para comprender los cambios, se llevaron a cabo mediciones de susceptibilidad magnética variando la temperatura en una muestra en polvo microcristalino del complejo en el rango de 5-290 K. En la Figura 19 se presenta la variación en función de la temperatura de la inversa de la susceptibilidad magnética molar (χ_m^{-1}) y el producto $\chi_m T$ ($\chi_m T = (\mu_{\text{eff}})^2/8$). Como puede verse, la magnitud de $\chi_m T$ permanece prácticamente constante hasta 20 K, la temperatura por debajo la cual los valores del momento efectivo magnético disminuyen rápidamente hacia cero. A temperatura ambiente, el valor obtenido de $\chi_m T$ es 0,885 cm³K/mol, que está cerca de los valores esperados para dos iones de cobre(II) no acoplados con $g = 2,18$ en concordancia con los resultados de EPR.

Por otro lado, la ley Curie-Weiss ($\chi_m = C_m (T + \Phi)$) se sigue en todo el rango de temperatura medido. Los valores calculados de C_m y la temperatura de Weiss (Φ) son 0,89 cm³K/mol y -1,7 K, respectivamente.

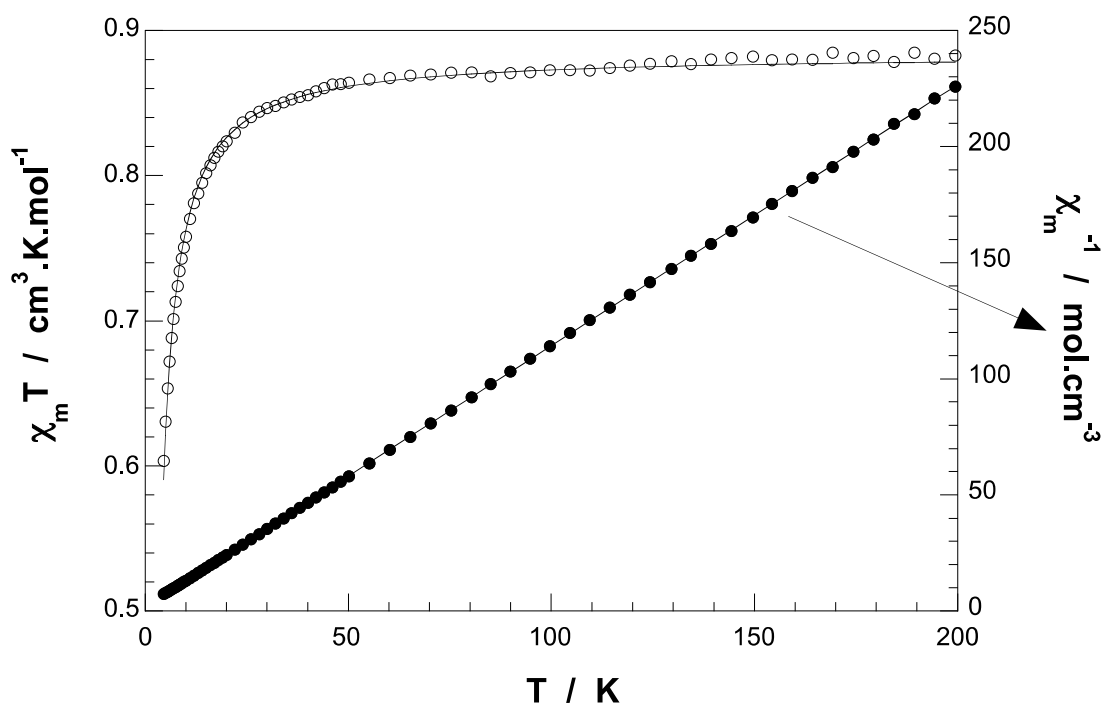


Figura 19. Susceptibilidad magnética del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ medida en el rango de temperatura de 5 a 290K.

Los aspectos mencionados anteriormente son indicativos de la aparición de acoplamiento antiferromagnético débil en el compuesto debido a la presencia de electrones desapareados en las entidades $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ en la red.

Se puede obtener una descripción más completa del comportamiento magnético observado mediante el uso de la ecuación de Bleaney-Bowers para

los dímeros de cobre⁴³, derivado del Hamiltoniano de spin de Heisenberg ($H = -2JS_1S_2$) para dos iones $S = 1/2$ acoplados:

$$\chi_m = (2Ng^2\beta^2/kT)[3 + \exp(-2J/kT)]^{-1}$$

donde N es el número de Avogadro, β el magnetón de Bohr y k la constante de Boltzmann.

El mejor ajuste obtenido de la ecuación anterior fue por el método de cuadrados mínimos (línea continua en la Figura 19) que permite obtener el parámetro de intercambio $J/k = -2,5$ K y el valor de $g = 2,17$; siendo el factor R de confiabilidad, $R = \sum [\chi_m T^{\text{exp}} - \chi_m T^{\text{cal}}]^2 / \sum [\chi_m T^{\text{exp}}]^2$, igual a $1,1 \times 10^{-5}$. La buena concordancia entre los datos experimentales y calculados confirma el predominio de las interacciones entre los centros de Cu(II) de las entidades $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ en este compuesto. El pequeño valor J observado implica una superposición pobre entre los orbitales magnéticos de los dos iones de cobre(II) en este complejo.

3.4.2. Derivados de metimidazol y Cu(II): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]$ (3).

Los datos obtenidos de la simulación de los espectros EPR de los complejos en estado sólido son concordantes con una geometría de coordinación cuadrado plana para el complejo(1) ($g_1 = 2,01$, $g_2 = 2,09$ y $g_3 = 2,19$ (Figura 20A) y el complejo(3) ($g_1 = 2,05$, $g_2 = 2,08$ y $g_3 = 2,19$ (Figura 20C) mientras que para el complejo(2) los datos sugieren una simetría axial de pirámide de base cuadrada ($g_{\parallel} = 2,28$ y $g_{\perp} = 2,07$ (Figura 20B)).

⁴³ B. Bleaney, K.D Bowers. *Proc R Soc London, Ser A.* **1952.** 214, 451-465.

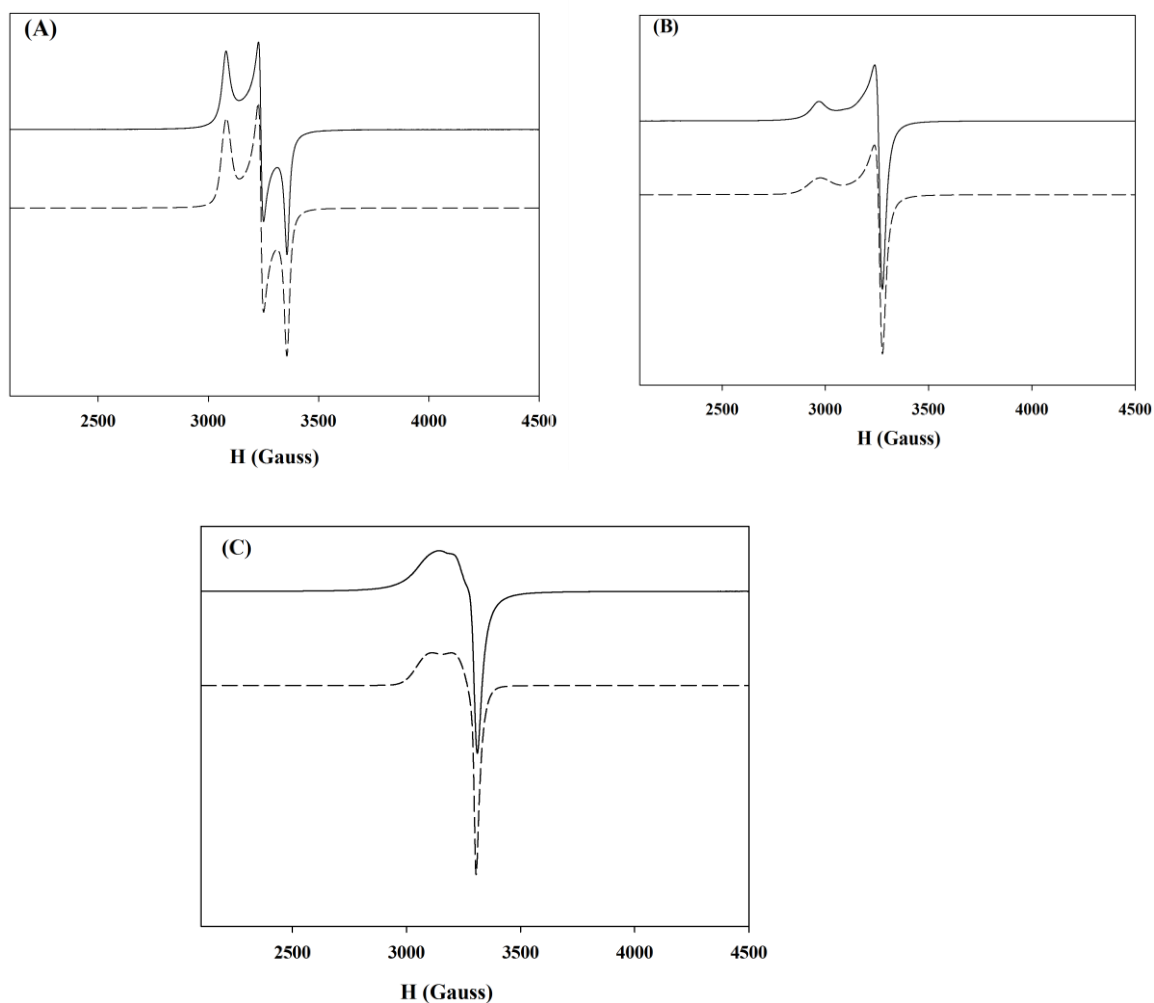


Figura 20. Espectros EPR banda X en polvo microcristalino (120K) de: $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) **(A)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2). **(B)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]$ (3). **(C)** Los espectros de líneas punteadas corresponden a los espectros simulados para cada uno de ellos.

3.5. Reflectancia difusa

3.5.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

En la Figura 21 se muestra el espectro de reflectancia difusa del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (polvo microcristalino) que resulta similar al obtenido para la forma hidratada.

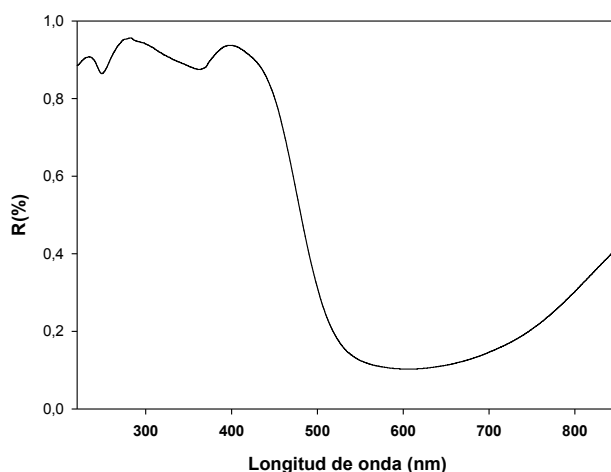


Figura 21. Espectro de reflectancia difusa del sólido del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.

Puede inferirse (para ambos complejos), la transición típica esperada para la banda d-d relacionada al Cu(II) en el entorno del anión $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ a valores de longitud de onda $> 850 \text{ nm}$, la cual es asignada a la transición ${}^2\text{B}_2 \rightarrow {}^2\text{A}_1$. En la región UV del espectro se observan las tres bandas típicas correspondientes a transiciones de transferencia de carga ubicadas a 401, 282 y 234 nm. El espectro obtenido es el esperado para este tipo de compuestos. Espectros de características similares⁴⁴ pueden encontrarse en la extensa bibliografía relacionada a entidades $[\text{CuCl}_4]^{2-}$.

3.5.2. Derivados de metimidazol y Cu(II): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2).

La coordinación que se propone es coincidente con los datos obtenidos en los espectros de reflectancia difusa donde existe un corrimiento de la banda hacia mayores longitudes de onda comparando los espectros del complejo(1) $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CuN_2Cl_2 , $\lambda_{\text{max}} = 413 \text{ nm}$) con el complejo(2) $\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}$ (CuN_2O_2 , $\lambda_{\text{máx}}=510 \text{ nm}$, 380 nm (hombro)) tal como se espera de acuerdo a los corrimientos observados para la serie espectroquímica de ligandos (Figura 22).

⁴⁴ E.N Golubevaa, V.I Pergushova, A.I Kokorinb, D.I Kochubeyc, V.V Kriventsovc, N.A Zubareva. *Kinet Catal.* **2008.** 49, 737-742.

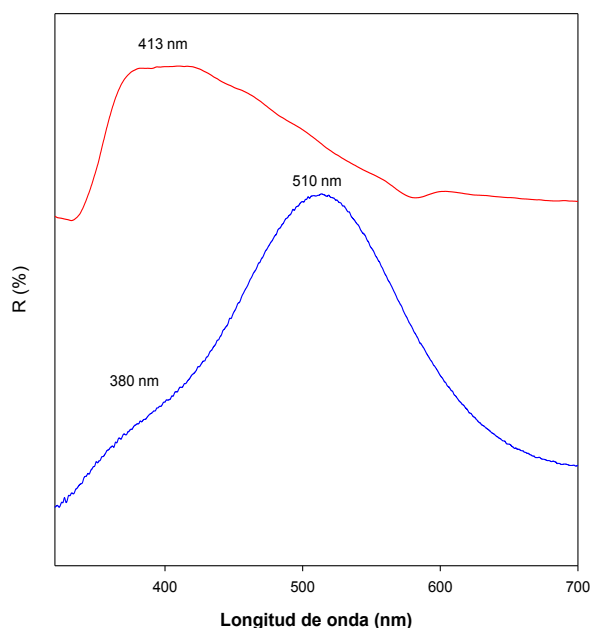


Figura 22. Espectros de reflectancia difusa experimental para los complejos [Cu(C₄H₅N₂S)₂Cl₂]·2H₂O(1) (rojo) y [Cu(C₈H₁₀N₄S)SO₄H₂O](2) (azul).

3.5.3. Derivado del ácido DL-pGlu y Mg(II): Mg(DL-pGlu)₂

Los espectros de reflectancia difusa del ligando (ácido DL-pGlu) y del Mg(DL-pGlu)₂ fueron también obtenidos. Se puede observar que aparece en el complejo de magnesio una nueva banda ubicada a 300 nm (Figura 23).

Esta nueva banda sirve de referencia ya que fue monitoreada por espectroscopía UV-vis durante la disolución del compuesto. Otra observación realizada es el corrimiento de la banda del ligando de 207 nm hacia la zona roja del espectro cuando se forma el complejo de magnesio.

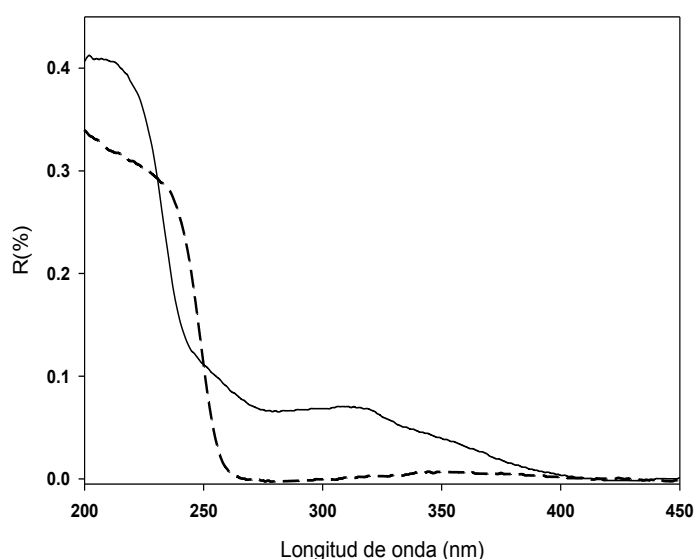


Figura 23. Espectros de reflectancia difusa del ácido DL-pGlu (línea discontinua) y Mg(DL-pGlu)₂ (línea continua).

3.5.4. Complejo de Mg(II) y N,N dimetilacetamida

En el espectro de reflectancia difusa realizado para MgDMA (Figura 24), se aprecia la presencia de tres bandas. Una aparece en la zona de mayor energía e intensidad (206 nm), mientras que las otras dos restantes se ubican con menor intensidad localizadas a 325 nm y a 264 nm. Estas bandas se encuentran desplazadas cuando se compara con los espectros hechos en solución (Figura 30). Estos cambios posiblemente sean ocasionados por el efecto del solvente.

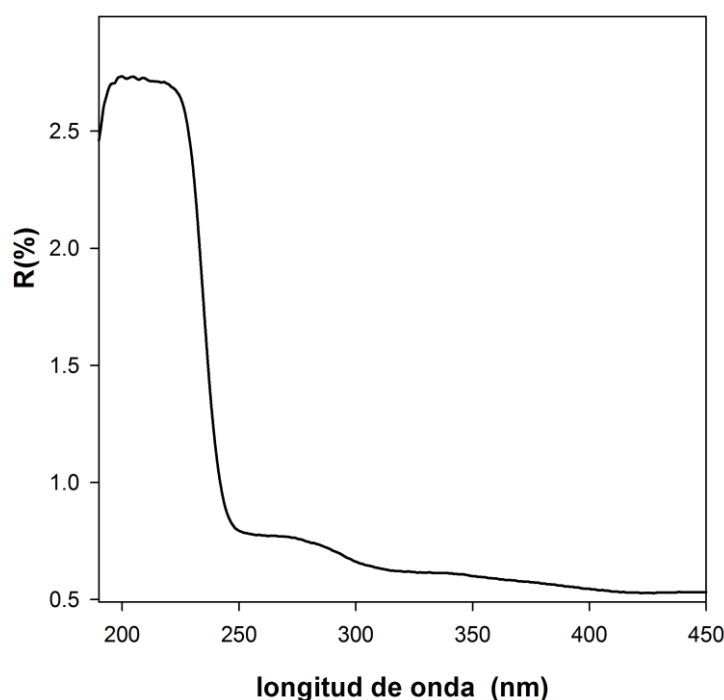


Figura 24. Espectro de reflectancia difusa del $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

3.6. Estudios de Estabilidad en solución

Para la caracterización de las especies bioactivas en solución, siempre que fuera posible, se utilizan: la espectroscopía UV-visible y medidas de conductividad de la solución a medida que transcurre el tiempo así como la determinación de los espectros de EPR (cuando corresponde).

Las bandas de absorción observadas en los espectros electrónicos UV-visible de los complejos de coordinación pueden estar asociadas a: (i) transiciones del tipo d-d entre niveles energéticos localizados esencialmente en el ion metálico, (ii) bandas de transferencia de carga que involucran tanto a orbitales del metal como del ligando y, (iii) transiciones internas de los ligandos (transiciones electrónicas entre los O.M del ligando).

La posición de las bandas de absorción correspondientes a las transiciones d-d, puede dar información sobre el tipo y característica de los ligandos, así como

sobre el estado de oxidación del metal y la geometría del complejo; mientras que su forma e intensidad (coeficiente de absorptividad molar, ϵ) proporcionan evidencias sobre la geometría del complejo así como sobre el grado de deslocalización electrónica.

Las transiciones “d-d”, ocurren entre los niveles t_{2g} y e_g del metal en complejos octaédricos y e_g y t_{2g} en complejos tetraédricos. Las bandas generadas a partir de estas transiciones están prohibidas por la regla de Laporte, para ambas geometrías pero la pérdida de simetría en los tetraedros permite un acoplamiento vibrónico mayor y un mayor valor de ϵ ya que la regla de Laporte se viola en menor grado. Esto explica sus bajos coeficientes de extinción molar con respecto a los complejos de transferencia de carga.

En una transferencia de carga metal-ligando (TCML o $d \rightarrow \pi^*$), un electrón que formalmente pertenece al metal se promueve a un orbital π^* del ligando. En una transferencia de carga ligando-metal (TCLM o $\pi \rightarrow d$), un electrón del orbital del ligando pasa a uno del metal, lo que ocurre generalmente para altos estados de oxidación. Estas transferencias se presentan, con elevados coeficientes de absorptividad molar^{45,46}.

3.6.1. Derivados de sertralina y Cu(II): $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

Debido a la similitud de los dos compuestos, la caracterización de la solución, así como los estudios biológicos y farmacológicos fueron realizados utilizando el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.

En primera instancia se llevó a cabo la medida de conductividad de una solución 1 mM del complejo en DMSO a 25°C. Pudo constatar que su valor permació constante durante 1 a 2 h. El valor obtenido de $\Lambda_M = 62 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ indica una naturaleza electrolítica 1: 2 para el complejo y es consistente con los valores encontrados para complejos metálicos 1:2 similares disueltos en DMSO⁴⁷.

Con la finalidad de corroborar la estabilidad de la especie en solución, se realizó el espectro UV-visible con una concentración de 0,004 M en DMSO en el que se pueden ver nuevamente las tres bandas de transferencia de carga similares a las observadas en el espectro sólido (Figura 21), sección reflectancia difusa) que se ubican a 258 nm ($\epsilon = 370,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 324 nm ($360,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) y ~400 nm (hombro)⁴⁸ (Figura 25).

Este espectro se mide durante 1 h y puede apreciarse que no existen cambios significativos en el mismo indicando que durante el tiempo de manipulación de los ensayos tanto *in vivo* como *in vitro* el complejo permanece estable.

⁴⁵ D. Sutton. *Ed Reverté Barcelona*. 1975.

⁴⁶ J.R Rivas Gispert. Química de coordinación .Ediciones Omega. Barcelona, España. 1975.

⁴⁷ W.J Geary. *Coord Chem*. 1971. 7, 81-122.

⁴⁸ D.W Smith. *Coord Chem*. 1976. 21, 93-158.

A mayores longitudes de onda el espectro muestra una banda ancha que se extiende a valores > de 900nm y se corresponde con la esperada transición d-d para la especie de Cu(II) presente en solución.

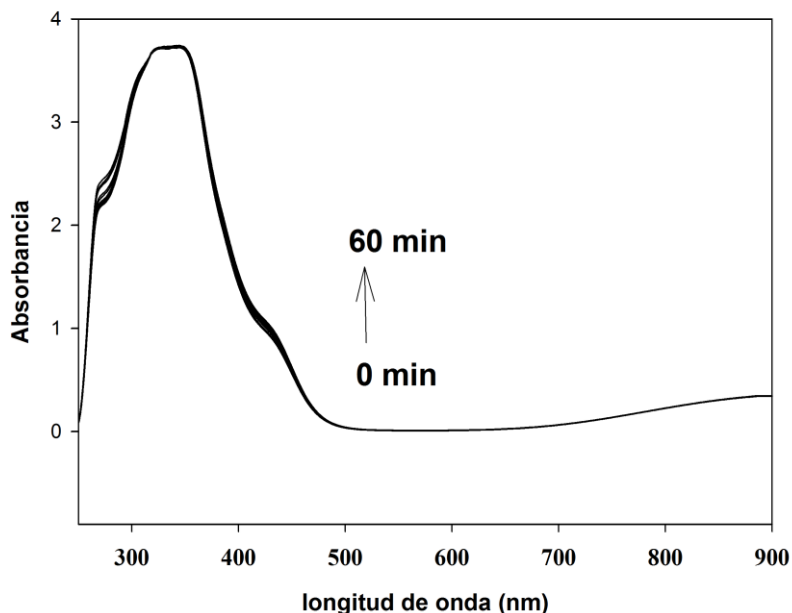


Figura 25. Espectros UV-Vis: determinación de la estabilidad del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ en solución de DMSO (4×10^{-3} M).

Finalmente, por espectroscopía EPR estas observaciones también se confirman (Figura 26). El espectro de una solución DMSO (1×10^{-3} M) del nuevo compuesto mostró sólo una línea de resonancia con lo que se asume la presencia de una única especie monomérica en solución.

La simulación de la señal sugiere que la misma es originada por un cromóforo de Cu(II) con los parámetros Hamiltonianos de spin de $g_{\text{iso}} = 2,175$ y la constante de acoplamiento hiperfina de $A_{\text{iso}} = 33 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$. Estos valores se encuentran en correlación con el esperado para especies del tipo CuCl_4^{2-} y confirman lo encontrado por espectroscopía UV-Visible y las medidas de conductividad⁴⁵.

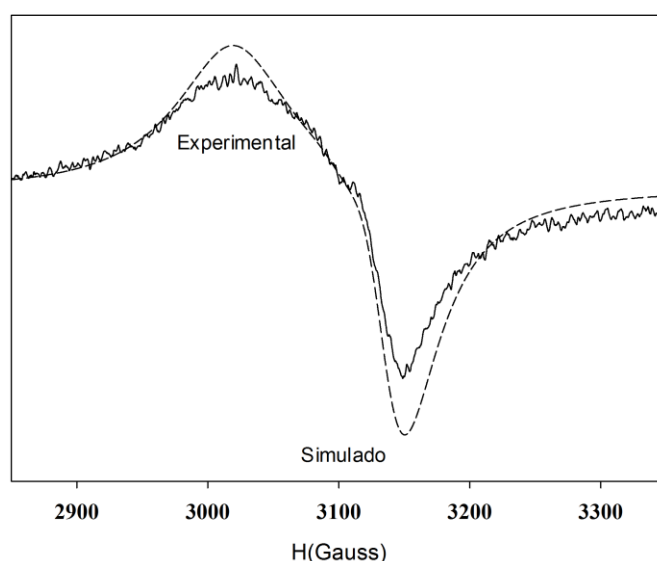


Figura 26. Espectro de EPR a temperatura ambiente del complejo $(\text{SerH}_2)_2 [\text{CuCl}_4]$ en solución de DMSO (1×10^{-3} M). Línea continua: experimental. Línea discontinua: simulación.

3.6.2. Derivados de metimidazol y Cu(II): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y $\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}(2)$

Como se observará a continuación, otras conclusiones derivan a partir de los estudios realizados por espectroscopía electrónica que refuerzan lo analizado para la coordinación propuesta. La coordinación a través del átomo de S se descarta por la ausencia en el espectro de reflectancia difusa y en el espectro en solución de una banda de transferencia de carga que es característica y se asigna a la transición⁴⁹ $\sigma\text{S} \rightarrow \text{Cu(II)}$ que aparece alrededor de los 600 nm con una valor de $\epsilon > 1000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este hecho coincide con la falta de disponibilidad del átomo de S para interactuar con el centro metálico.

El espectro UV-vis obtenido para el complejo(1) en solución de DMSO exhibe una banda localizada en 645 nm ($\epsilon = 248 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $1,25 \times 10^{-3}$ M) y para el complejo(2) en solución metanólica se observa en 695 nm ($\epsilon = 67,1 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$; $4,8 \times 10^{-3}$ M) (Figuras 27A y B, respectivamente). Ambas bandas son típicas para las transiciones d-d del Cu(II). Por otra parte es posible observar en ambos compuestos la presencia de una banda en 400 nm que surge por la transferencia de carga⁵⁰: $\text{N} \rightarrow \text{Cu(II)}$.

Los cambios que se observan de las bandas cuando se lo compara con el espectro de reflectancia difusa del sólido podrían atribuirse al efecto del disolvente.

⁴⁹ D.A Baldwin, J.C.A Boeyens, R.G Copperthwaite, J.H.N Loubser, A.J Markwell. *J Crystallogr Spectrosc.* **1984.** 14, 157-167.

⁵⁰ N.A Bell, W. Clegg, S.J Coles, C.P Constable, R.W Harrington, M.B Hursthouse, M.E Light, E.S Raper, C. Sammon, M.R Walker. *Inorg Chim Acta.* **2004.** 357, 2091-2099.

Como se sabe, es de gran relevancia al momento de realizar estudios biológicos comprobar la estabilidad del complejo en el solvente a utilizar. En este caso los estudios se hicieron, siguiendo el espectro UV-Vis en función del tiempo, en sus respectivos disolventes. Durante el tiempo de duración del ensayo (60 minutos) (Figuras 27A y B, respectivamente) no hubo variaciones significativas en la intensidad de la absorbancia de las bandas espectrales.

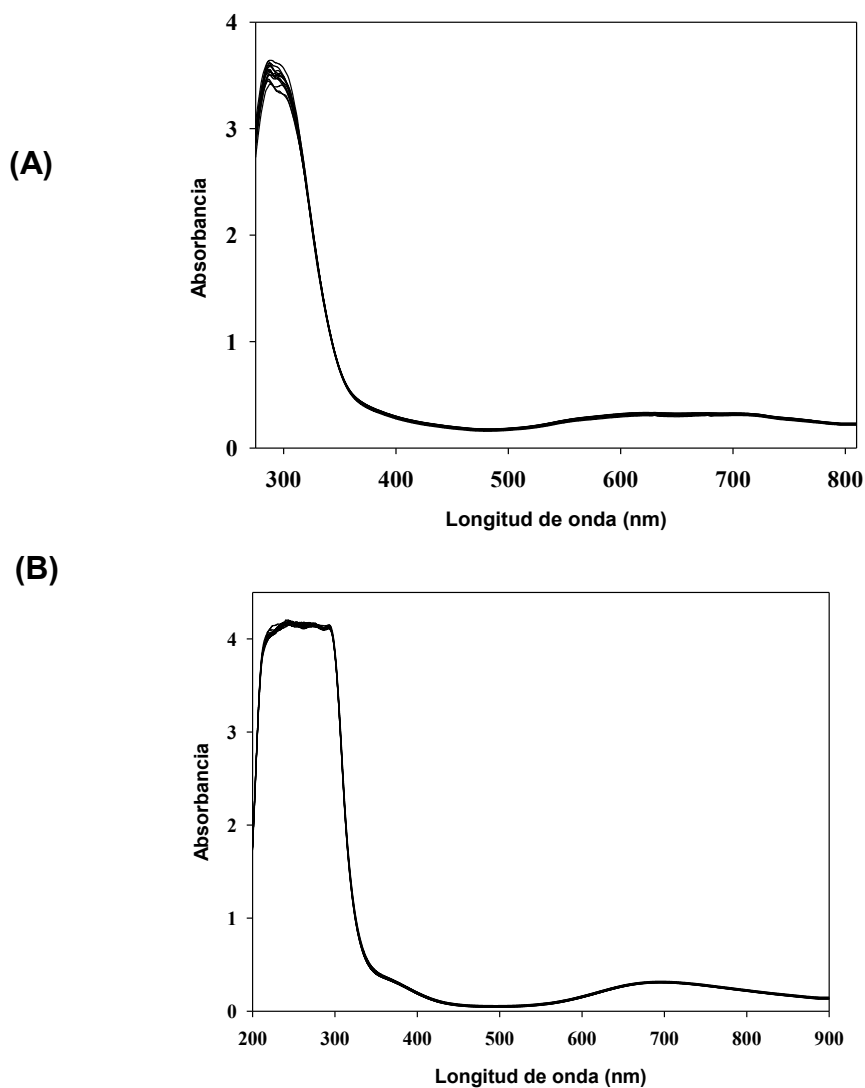


Figura 27. Espectros electrónicos de los complejos: **(A)**. $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,25 \times 10^{-3}$ M) en solución de DMSO y **(B)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ ($4,8 \times 10^{-3}$ M) en solución de metanol; a distintos tiempos entre 0 y 60 minutos.

Por tanto, se sugiere la estabilidad de los compuestos en las condiciones ensayadas, lo que permite proceder con la determinación de las propiedades antioxidantes y demás pruebas en el rango de tiempo y con el solvente usado.

En relación a las medidas de conductividad, se determinaron en primera instancia en aquellos solventes en los cuales los compuestos presentaban mayor solubilidad.

Los complejos derivados de metimidazol son solubles en dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida y en metanol en caliente.

Para las medidas biológicas, los complejos se disuelven inicialmente en DMSO y la mezcla de reacción contiene un 0,5% de solvente que es la usada en los posteriores experimentos.

Las medidas de conductividad se realizan a 25°C obteniéndose valores de $\Lambda_M = 6,7 \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1,4 \times 10^{-3}$ M, DMSO) y $\Lambda_M = 5,3 \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1,0 \times 10^{-3}$, DMSO) para los complejos(1) y (2) respectivamente. De los resultados obtenidos puede considerarse que los compuestos no se disocian en solución. Ya que los valores de conductividad Λ_M para las sustancias con una relación 1:1; en los solventes estudiados (DMSO y DMF), debería ser de $\geq 70 \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ⁽⁵¹⁾. La conductividad molar de las soluciones permanecen constantes entre 1-2 h de realizada la disolución. Esta información adicional, confirma la estabilidad medida en los compuestos sintetizados en el solvente de trabajo.

Como parte de las ventajas que ofrece la espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) está el hecho de poder también establecer el entorno de coordinación y la geometría del complejo que se forma luego de la disolución del mismo en el solvente adecuado. De esa forma es posible inferir si la estructura del complejo sólido se retiene en solución o si ocurre algún cambio debido a la interacción con el solvente. En particular, el solvente utilizado para los ensayos biológicos es el DMSO y como podrá apreciarse a continuación, los datos muestran que la esfera de coordinación se mantiene tras la disolución del compuesto sólido.

En los tres complejos, los espectros de EPR en solución indicaron la existencia de especies monoméricas y simetría rómbica, con tres valores típicos del parámetro g. Todos ellos mostraron las cuatro bandas típicas para complejos de cobre(II) ($I=3/2$). En el espectro del complejo(1) ($1,25 \times 10^{-3}$ M, DMSO, Figura 28A) los valores de g obtenidos son: $g_1 = 2,06$, $g_2 = 2,03$ y $g_3 = 2,17$ sugiriendo la conservación de la geometría planar. Estos parámetros son similares a otros complejos de cobre con similares entornos de coordinación ⁵².

Para el complejo(2) ($4,8 \times 10^{-3}$ M, metanol, Figura 28B) los resultados de la simulación fueron: $g_1 = 2,062$, $g_2 = 2,072$ y $g_3 = 2,322$ ($g_{\text{iso}} = 2,152$) y en este caso, fue posible obtener un valor para la constante de acoplamiento hiperfino $A_1 = 25,25 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $A_2 = 25,35 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $A_3 = 162,15 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ($A_{\text{iso}} = 70,92 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_3/A_3 = 143$). Teniendo en cuenta la aproximación de Blumberg–Peisach, f ($f = g/A$) el valor obtenido se corresponde con la esfera de coordinación propuesta.

⁵¹ W.J Geary. *Coord Chem Rev.* **1971**. 7, 81-122.

⁵² (a) R. Dudley, B.J Hathaway. *J Chem Soc A.* **1970**, 1725-1758 (b) R.G McDonald, M.A Hitchman. *Inorg Chem.* **1990**. 29, 3074-3080.

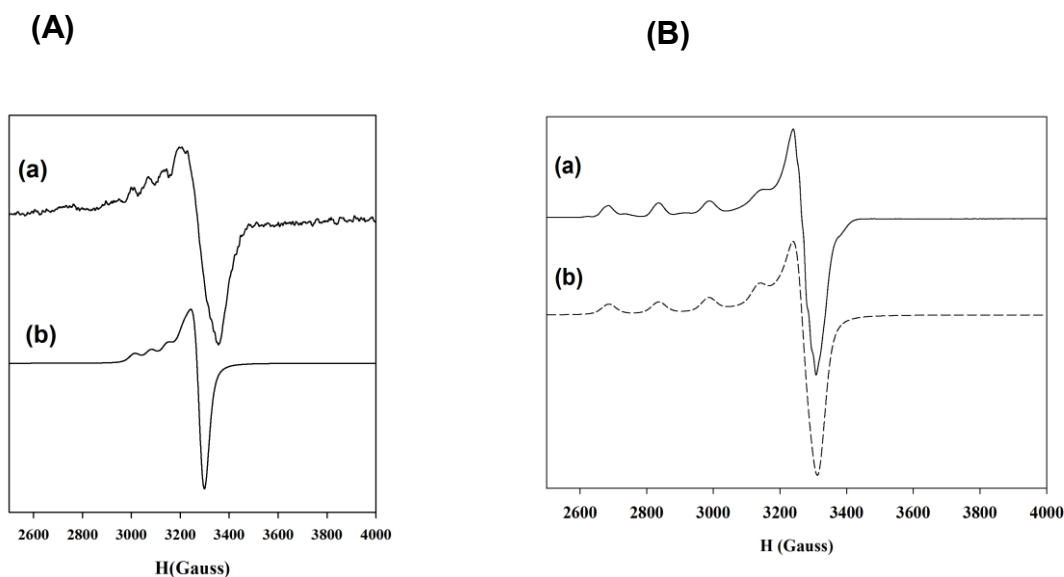


Figura 28. Espectros de EPR en solución ((a) Experimental, (b) simulado): **A)** $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y **B)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]\cdot \text{H}_2\text{O}$

Hay dos posibles configuraciones probables que pueden adoptar los complejos con número de coordinación cinco: cuadrado piramidal y bipirámide trigonal, caracterizados por estados basales dx^2-y^2 y dz^2 , respectivamente. Para un sistema con $g_3 > g_2 > g_1$, la relación **R** definida como $(g_2 - g_1)/(g_3 - g_2)$, es utilizada con el propósito de discernir a cuál de ellos corresponde. Se sabe que si el valor de **R** es mucho más grande que 1, el estado basal que predomina es dz^2 y si el valor es menor que 1, el que predomina es el dx^2-y^2 . Para este complejo el valor de R calculado fue de 0,04 lo que sugiere una geometría pirámide de base cuadrada distorsionada.

3.6.3. $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$. Estudios en solución: Estabilidad y titulación espectrofotométrica

Para poder llevar a cabo los estudios *in vitro* como ensayos biológicos, en primera instancia es importante poder determinar que el complejo permanece estable luego de ser disuelto en solución, ya que esta propiedad puede variar de acuerdo al solvente usado.

Para ello se evalúa la estabilidad del $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ en solución acuosa, midiendo la variación en el tiempo de las medidas espectrales en el UV-Vis (0,26 M) así como la conductividad molar (1×10^{-3} M) ya que ésta determina cuál es el grado de disociación de las especies presentes en distintos solventes y así se determina la estabilidad en solución. Para la disolución de los compuestos se procedió de la siguiente manera: para los experimentos *in vitro* se utilizó una mezcla de DMF: H_2O (10:1) y para las los experimentos *in vivo* los compuestos se disolvieron en agua. Para el primer caso la conductividad de una solución del complejo (1×10^{-3} M) permanece constante ($\Lambda_M = 14,0 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) durante el tiempo de medida (1 h). Se puede asumir que el compuesto en solución no es un electrolito en la mezcla de DMF/ H_2O . El valor

de conductividad para un electrolito 1:1 en solución DMF-H₂O debería tener un valor experimental de $\Lambda_M \geq 70 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ en este solvente⁵³.

Para el medio acuoso, se utiliza una solución $1 \times 10^{-3} \text{ M}$. En este caso el valor obtenido es de $\Lambda_M = 130 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ que concuerda con un electrolito⁵⁴ 1:1. De forma comparativa se midieron MgCl_2 ($\Lambda_M = 203 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ($\Lambda_M = 191 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) en las mismas condiciones experimentales. A esta instancia es importante mencionar que existen estudios previos en la literatura relacionados a estudios de especiación sobre el Mg(II) con los ácidos L⁵⁵- y DL-ácido piroglutámicos⁵⁶. En el primer caso, no se detecta la formación de complejo con magnesio mientras que en el segundo, utilizando un electrodo selectivo de iones de magnesio, se detectó la formación de un complejo de relación 1:1 M/L. Evidentemente, la presencia del ácido DL-piroglutámico en su forma racémica favorece la interacción y la formación de complejo. Por lo tanto, se puede ver que a concentraciones más bajas ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) la disolución en agua puede producir una disociación parcial del complejo formando probablemente especies catiónica como $[\text{Mg}(\text{Pyr})(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ junto con la presencia del anión piroglutamato Pyr^- , que da lugar a un valor de conductancia molar correspondiente a una especie 1:1 en solución. Sin embargo, no se observó una disociación parcial en los valores de concentraciones más altas utilizados para los experimentos *in vivo*.

También se obtuvo información adicional a partir de las medidas obtenidas del espectro UV-Vis vs tiempo. Los espectros en solución acuosa (0,26 M) fueron medidos a distintos tiempos y se encontró que después de 1 h de que la solución fue preparada, no existían cambios espectrales significativos (Figura 29, línea sólida). El espectro muestra una banda característica localizada a 300 nm (probablemente se deba a una banda de transferencia de carga L→M) la cual no aparece en el ligando (Figura 29, línea punteada) cuando se usa el mismo solvente en ambas medidas. Como mencionamos previamente, esta banda permanece en el complejo sólido y se retiene en solución (Figuras 24 y 29). A diferencia de otros compuestos de magnesio, como el gluconato de magnesio ($\text{MgC}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$)⁵⁷, esta banda aparece como una nueva además de las bandas típicas que pueden verse en a. 220 nm y 230 nm en el ácido DL-pGlu y en el complejo metálico (Figura 29). Estas se atribuyen a transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ las cuales aparecen cuando la diferencia de energía existentes entre los orbitales HOMO y LUMO es mucho mayor que la energía de activación del compuesto⁵⁸. De forma similar a lo que ocurre con el ácido L-Glu⁵⁹, se observan en el espectro del ácido DL-pGlu y se encuentran ligeramente desplazados en el complejo.

⁵³ W.J Geary. *Coord Chem.* **1971.** 7, 81-122.

⁵⁴ I. Ali, W.A Wani, K. Saleem. *Synth React Inorg M.* **2013.** 43, 1162-1170.

⁵⁵ C. Blaquiere, G. Berthon. *Inorg Chim Acta.* **1987.** 135, 179-181.

⁵⁶ A.K Covington, E.Y Danis. *J Solution Chem.* **2009.** 38, 1449-1462.

⁵⁷ M.K Trivedi, N. Dixit, P. Panda, K.K Sethi, S. Jana. *J Pharm Anal.* **2017.** 7, 332-337.

⁵⁸ M.K Trivedi, A. Branton, D. Trivedi, G. Nayak, B.D Wellborn, D.L Smith, D.A Koster, E. Patric, J. Singh, K.L Vagt, K.J Callas, P. Panda, K.K Sethi, S. Jana. *IJPC.* **2017.** 3, 1-12.

⁵⁹ T.B Issa, F. Sayari, H. Ghalla, L. Benhamada. *J Mol Struct.* **2019.** 1178, 436-449.

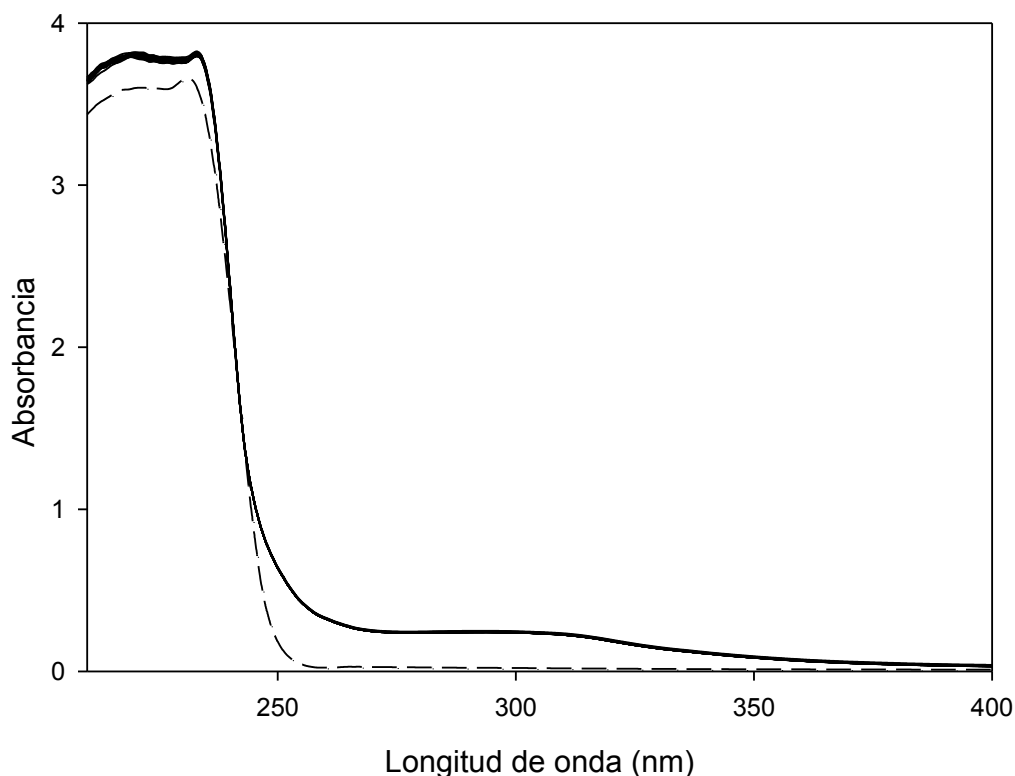


Figura 29. Estabilidad en solución: espectros UV-Visible en solución acuosa de $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ (0,26 M) (tiempo de acumulación del espectro: 1h, línea continua) y ácido DL-pGlu (0,26 M) (línea punteada).

Estos resultados junto con las medidas de conductividad sugieren que durante el tiempo de manipulación para los ensayos *in vitro* (15 min) el complejo permanece estable.

3.6.3.1. Detección de la especie en solución: titulación espectrofotométrica

Con la finalidad de detectar la especie que se forma en solución se realizó una titulación espectrofotométrica. La misma se realiza simulando las condiciones de la síntesis solvothermal (las condiciones del reflujo fueron a 100°C , con N,N-dimetilacetamida como solvente) para confirmar que la estequiometría que predomina durante la preparación del complejo es una relación de ligando(L)-metal(M) de 2:1. El experimento comienza a partir de una relación 10:1 L/M (ligando-metal) hasta llegar a una relación 0,5:1 L/M. En estas condiciones se observó que la banda a 300 nm estaba presente y que su intensidad iba aumentando a medida que se añadían a la solución distintas cantidades de $\text{Mg}(\text{II})$ (Figura 30A). A partir del gráfico de absorbancia a 300 nm vs la relación L/M (Figura 30B), se pudo determinar la formación de un complejo metálico 2:1 DL-pGlu/ $\text{Mg}(\text{II})$, que está en concordancia al obtenido durante la síntesis solvothermal.

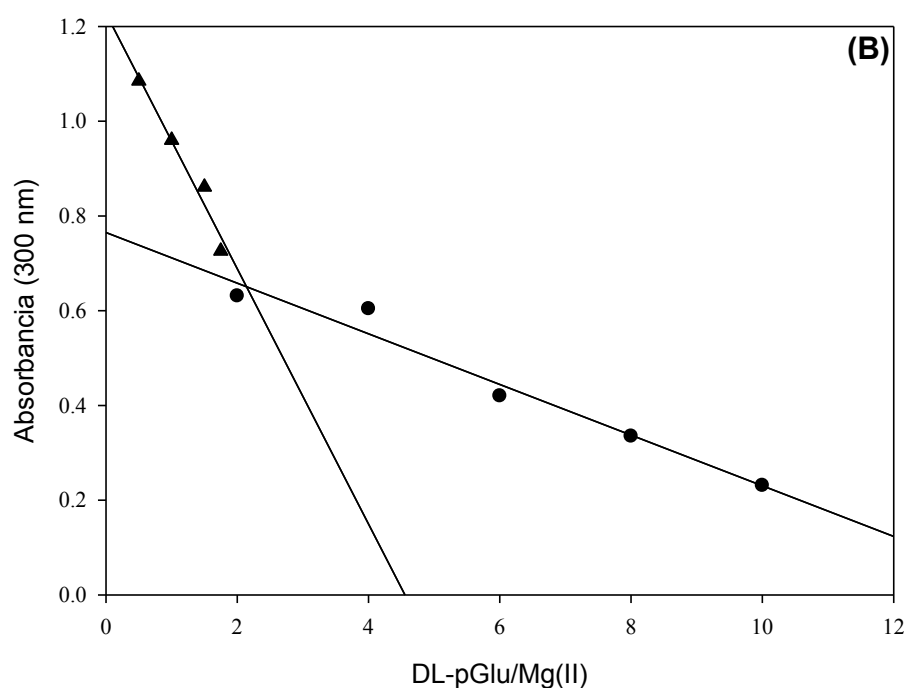
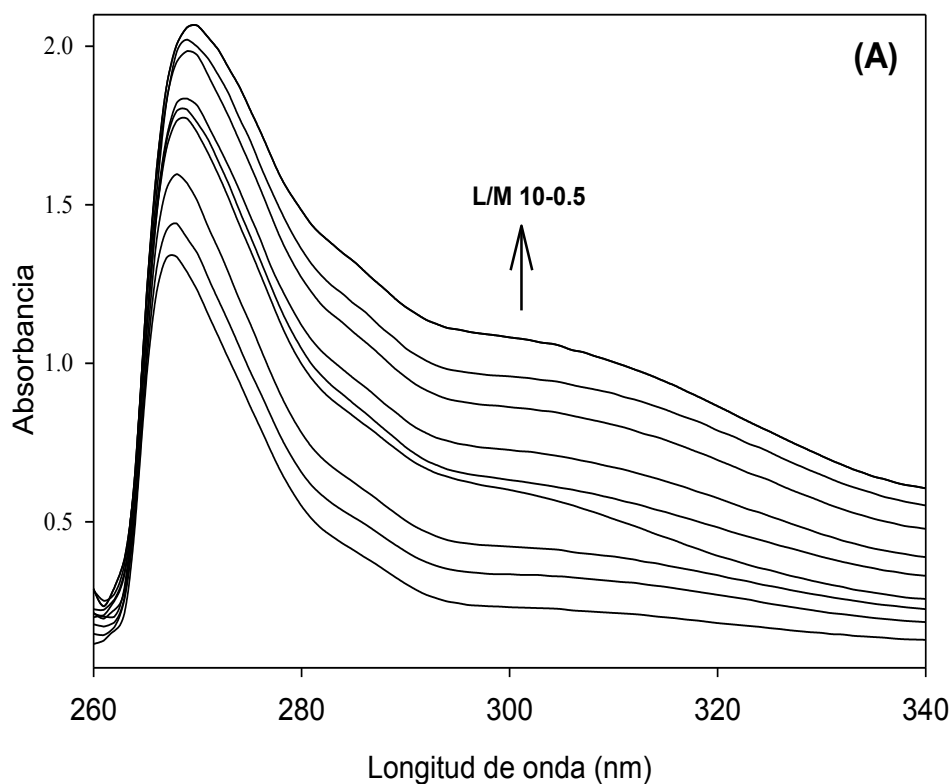


Figura 30. (A) Espectros UV-Vis de la titulación espectrofotométrica del ácido DL-pGlu en N,N-dimetilacetamida (100 °C) con concentraciones crecientes de Mg(II) con una relación de ligando-metal (L: M) de 10,0 a 0,5. La flecha indica los aumentos de concentración del metal. **(B)** Determinación espectrofotométrica de la estequiometría del complejo Mg(II):DL-pGlu en solución a 300 nm.

3.6.4. Estabilidad de solución del complejo de MgDMA

Los espectros electrónicos del complejo y del ligando pueden observarse en la Figura 31. El espectro UV del ligando, exhibe una fuerte banda de transferencia de carga (TC) centrada a 228 nm (210 nm en la solución 1×10^{-4} M), la cual se puede ver también en el complejo (Figura 31). Por otro lado aparecen para el MgDMA, otras dos bandas pero de menor intensidad en la región de 260-280 nm (Figura 31).

En la DMA, la intensa banda centrada en 228 nm (210 nm en la solución 1×10^{-4} M), es asignada a la transición electrónica $\pi \rightarrow \pi^*$. En el complejo esta banda se mantiene pero aparece desplazada (215 nm en la solución 1×10^{-3} M). En cambio las otras dos bandas de menor intensidad que se ven en el complejo de magnesio pueden asociarse a la forma cargada del ligando^{60,61}.

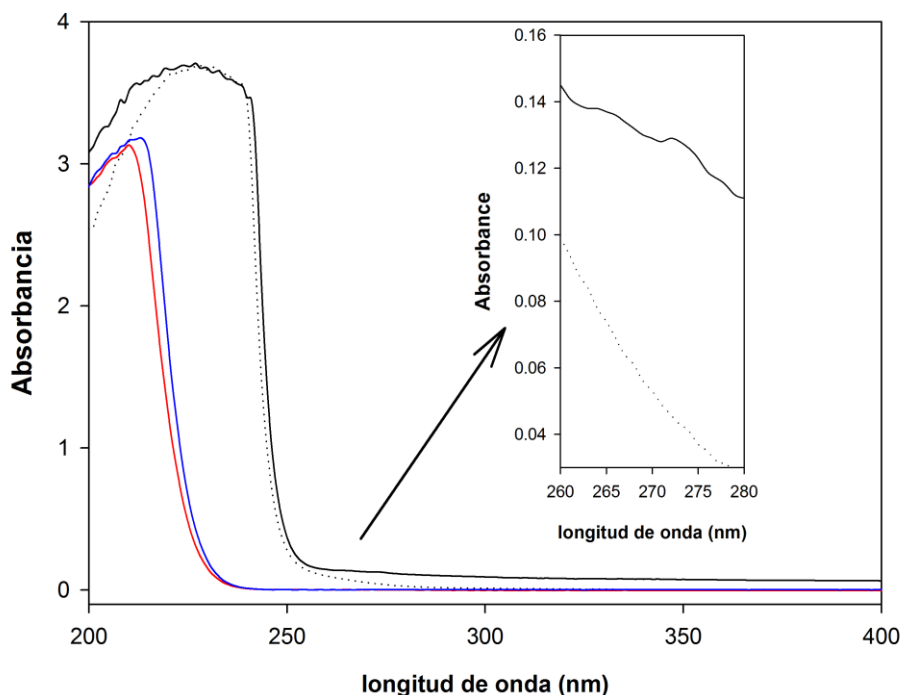


Figura 31. Espectros electrónicos UV-vis de DMA (línea punteada 0,26 M, línea roja 1×10^{-4} M) y de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en solución acuosa (línea sólida corresponde a 0,5 M y la línea de color azul a una concentración 1×10^{-3} M).

Con la finalidad de saber si el compuesto permanece estable se midieron durante una hora los espectros electrónicos UV-vis de los compuestos en solución para registrar si hay cambios del mismo a medida que transcurre el tiempo. Los resultados obtenidos indicaron que durante el tiempo de ensayo los

⁶⁰ E. Benedetti, B. Di Blasio, P. Baine. *J Chem Soc Perkin Trans.* **1980.** 2, 500-503.

⁶¹ K.S Dahl, D.C Luehrs. *Z Inorg, Nucl Chem.* **1976.** 38, 1773-1774.

espectros permanecen inalterables y se mantienen las bandas descritas anteriormente.

Por otro lado la conductividad molar medida en solución acuosa da un valor de $190 \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. Esto indica que la naturaleza del compuesto es de tipo electrolítica dando una relación 1:2. Esto revela que la forma que tiene el catión del complejo es $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^{+2}$ con los dos cloruros por fuera de la esfera de coordinación actuando como contraiones.

Al mismo tiempo, y con la finalidad de reforzar las medidas de estabilidad en solución, se midió la conductividad molar del MgDMA (10^{-3} M) en medio acuoso durante 2 horas a 25°C , confirmándose que se mantiene constante dado que el valor de la conductividad permaneció inalterable.

Dado que en los estudios de estabilidad mediante UV-vis en solución acuosa la banda característica localizada en 228 nm permanece constante y que los resultados de las medidas de conductividad muestran también constancia de las especies en solución, se puede sugerir que el compuesto permanece estable y que durante el tiempo de manipulación para los ensayos *in vitro* (15 minutos) no se producen alteraciones en el mismo.

3.6.4.1. Simulación computacional espectro UV-vis de MgDMA:

Para las transiciones electrónicas podemos asignar las bandas que aparecen en el espectro UV-vis calculado comparándolo con el experimental. (Figura 32)

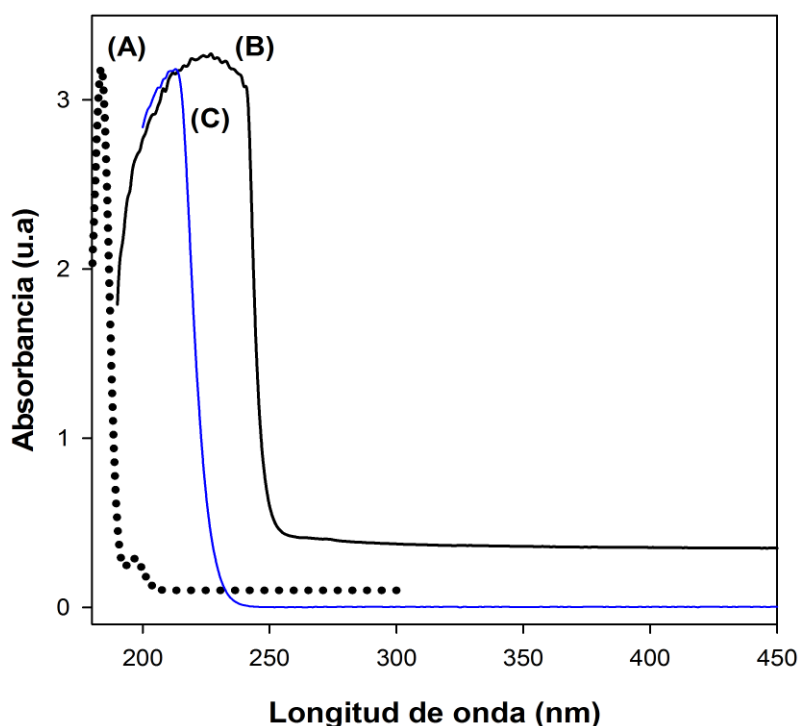
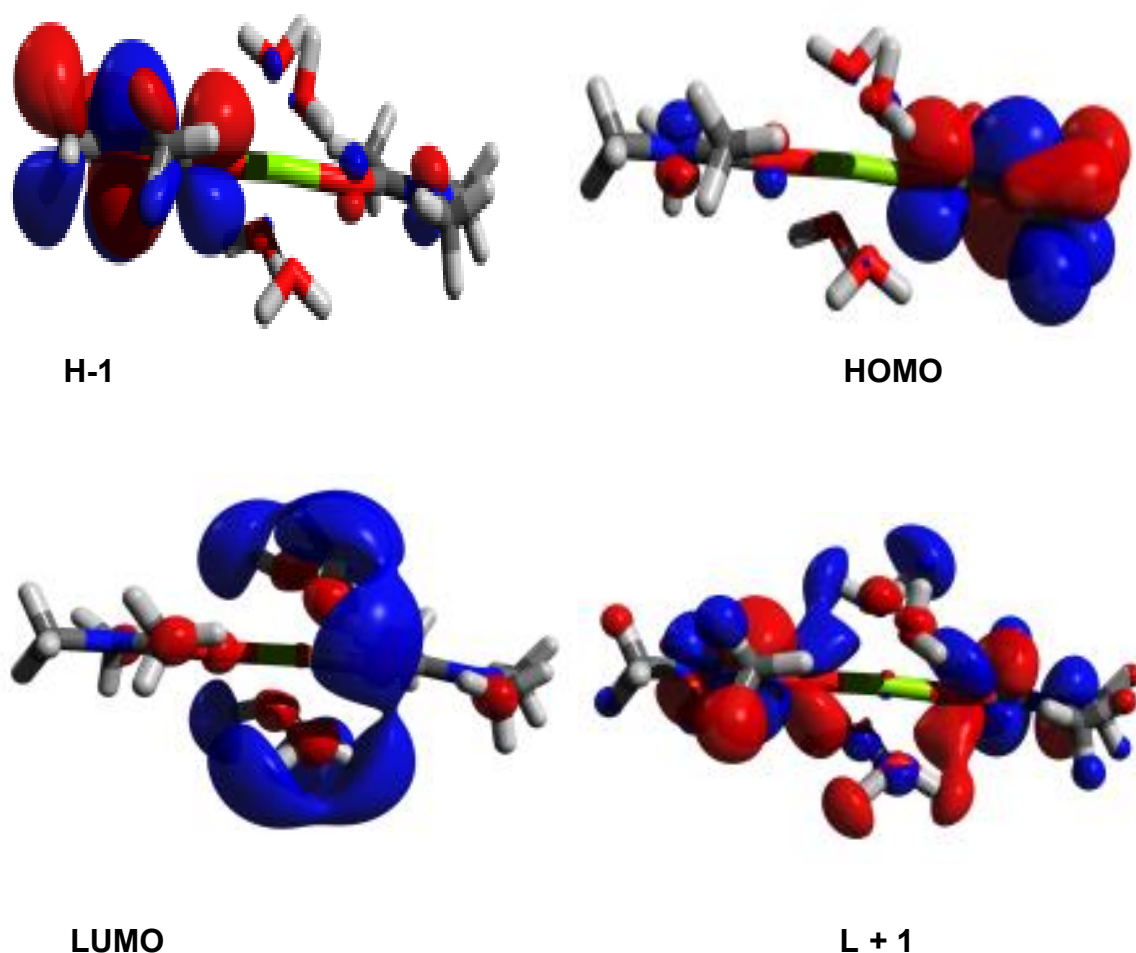


Figura 32. Espectros de absorción en solución acuosa para el complejo $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: **(A)** Calculado, línea punteada, **(B)** experimental, para una solución acuosa 0,5 M y **(C)** experimental para una solución acuosa $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ (azul).

Los resultados del análisis del espectro electrónico muestran los orbitales que originan las contribuciones mayores en las transiciones electrónicas, y por tal razón se muestran sus porcentajes de contribuciones a la formación de los mismos (Figura 33). Los cálculos obtenidos son razonables respecto de los experimentales.



198 nm (0,0115)	HOMO→LUMO (86%)
197 nm (0,0172)	H-1→LUMO (85%)
195 nm (0,0122)	H-3→L+1 (31%), H-3→L+2 (35%), H-3→L+4 (16%)
184 nm (0,6637)	H-1→L+1 (35%), HOMO→L+1 (33%)
183 nm (0,0167)	H-1→L+1 (39%), HOMO→L+1 (39%), H-1→L+2 (11%)

Figura 33. Asignaciones calculadas para el espectro UV-vis simulado del MgDMA.

Los orbitales H-1 HOMO y H-3 localizan las densidades electrónicas en los ligandos dimetilacetamida, H-1 y HOMO principalmente en los grupos metilos y en el nitrógeno y H-3 mayoritariamente en los átomos de oxígeno. LUMO distribuye su densidad electrónica en el entorno de las moléculas de agua de

coordinación, mientras que L+1, L+2 y L+4 lo hacen sobre los ligandos de dimetilacetamida

Las transiciones de 198 y 197 nm son tipo transferencia de carga $L \rightarrow L$ desde orbitales localizados en dimetilacetamida hacia orbitales localizados en las moléculas de agua, mientras que la de 195 nm es similar pero desde orbitales sobre dimetilacetamida a otros similares sobre las mismas moléculas. Las de 184 nm y 182 nm son del mismo tipo que la de 195 nm.

3.7. Conclusiones

En este capítulo se muestran los siete compuestos preparados en el transcurso de esta tesis doctoral.

Derivados de Cobre(II) y Clorhidrato de sertralonio:

Los derivados del antidepresivo sertralina se obtuvieron como monocristales pudiéndose establecer mediante difracción de rayos X su estructura cristalina y ser formulados como $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$. Las moléculas de sertralina aparecen en ambos compuestos en su forma protonada (SerH_2^+) sobre el grupo amino y ambas muestran una flexibilidad conformacional significativa. Las sales cristalinas formadas se estabilizan aún más mediante enlaces intermoleculares del tipo $\text{NH}_2^+ \dots [\text{CuCl}_4]^{2-}$ y adicionalmente en la forma hidratada se presentan enlaces $\text{NH}_2^+ \dots \text{O}(\text{agua})$ y $\text{O}(\text{agua})-\text{H} \dots \text{Cl}$. Los métodos de análisis estudiados FTIR, Raman, reflectancia difusa, UV-vis y EPR mostraron características típicas de los compuestos de tetraclorocuprato (II).

En particular la presencia de agua en la forma hidratada pudo ser diferenciada y determinada tanto por la banda característica en el espectro FTIR (1600 cm^{-1}) como por su ausencia en el espectro Raman así como los estudios DTA y su pico endotérmico característico para la misma. Otra de las características adicionales de las estructuras obtenidas fueron sus enlace hidrógenos no convencionales NH-X. Ambos compuestos dieron en solución una especie bioactiva similar por lo que se utilizó sólo uno de ellos para los ensayos biológicos.

Derivados de Cobre(II) y Metimidazol

Para los derivados de metimidazol con Cu(II) se obtuvieron tres complejos $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1), $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]$ (3) en los cuales existió una interesante transformación química del ligando formando puente disulfuro en (1) y sulfuro en (2) y (3) diferenciándose estos últimos sólo por la coordinación de una molécula de agua en (2) que pudo ser identificada tanto por FTIR y análisis del DTA.

El complejo (2) se obtuvo en forma cristalina pero su estructura ya había sido reportada previamente aunque el método de síntesis utilizado fue muy diferente al de esta tesis doctoral. Además, no se encontró en la literatura estudios relacionados a sus aplicaciones biológicas, por tanto las que se muestran en esta tesis fueron realizadas por primera vez para un compuesto de este tipo. Para una correcta asignación de la presencia de los disulfuros se procedió a

preparar un ligando disulfurado para su comparación por espectroscopía FTIR. La confirmación de los entornos de coordinación fue avalada por el resto de las técnicas de caracterización utilizadas. En particular, la espectroscopía EPR nos permitió proponer las coordinaciones cuadrada plana para (1) y (3) y la coordinación piramidal para el complejo (2). En forma similar a lo antes mencionado los complejos (2) y (3) presentan la misma especie bioactiva en solución por lo que se utilizó el complejo (2) para los ensayos *in vitro*.

Compuestos derivados de Magnesio on DL-piroglutámico y N,N-Dimetilacetamida

Los complejos con magnesio obtenidos fueron dos y ambos se obtuvieron en forma cristalina pudiéndose determinar sus estructuras por el método de difracción de rayos X.

Para el complejo con el ácido DL-piroglutámico el uso de la forma racémica del ligando favoreció la formación de cristales ya que si bien es conocida el fármaco denominada pisolato no se conoce fehacientemente su estructura química. El compuesto de esta tesis pudo caracterizarse exitosamente por medio de las espectroscopías de FTIR, Raman, UV-Vis y todas las técnicas antes mencionadas y el interés principal del mismo radicaba en su uso como agente antidepresivo dado los estudios pre-existentes relacionados principalmente al Mg(II) y que se discutirán posteriormente.

También en este tesis se pudo obtener un complejo cristalino utilizando N,N-dimetilacetamida (DMA) un solvente farmacológicamente reconocido. En este compuesto la DMA coordina al mismo en su forma protonada y la estructura se estabiliza adicionalmente por sendos puentes de hidrógeno incluido los no convencionales conteniendo Cl⁻.

La cristalización de compuestos de magnesio es químicamente compleja y por eso uno de los logros de la tesis es presentar compuestos con sus estructuras cristalinas resueltas.

La química de la DMA también resultó interesante y se pudieron comprobar propiedades biológicas tanto para el ligando como el complejo que se muestran en los capítulos subsiguientes.

CAPÍTULO 4

Actividades biológicas *in vitro*.

Capítulo 4. Actividades Biológicas *in vitro*

4.1. Hipertiroidismo y enfermedad de Graves Basedow

La enfermedad de Graves afecta al 0,5% de la población y es la responsable del 50 al 80 % de los casos de hipertiroidismo^{1,2}. Este padecimiento, es un tipo de enfermedad autoinmune que se origina por la unión de los anticuerpos IgG que activan la proteína¹ G acoplada al receptor 1 (este es el receptor de tirotrófina de la glándula tiroides). Esta activación es la responsable de estimular tanto la hipertrofia folicular y la hiperplasia, causando el aumento de tamaño de la glándula como el incremento de la producción de las hormonas tiroideas triiodotironina (T3) y tetraiodotironina (T4) (Figura 1).

El mecanismo de acción que se propone para la enzima tiroideoperoxidasa TPO, (glicoproteína con un grupo hemo) es, en primer lugar, la oxidación del grupo hemo por medio del peróxido de hidrógeno endógeno. Entonces la forma oxidada reacciona con el yodo para formar un intermediario el cual reacciona con los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg) para formar la monoiodotirosina y la diiodotirosina. Posteriormente un acoplamiento intramolecular subsiguiente de la MIT y DIT genera triiodotironina (T3), y el acoplamiento de dos moléculas de DIT forma tiroxina (T4)³.

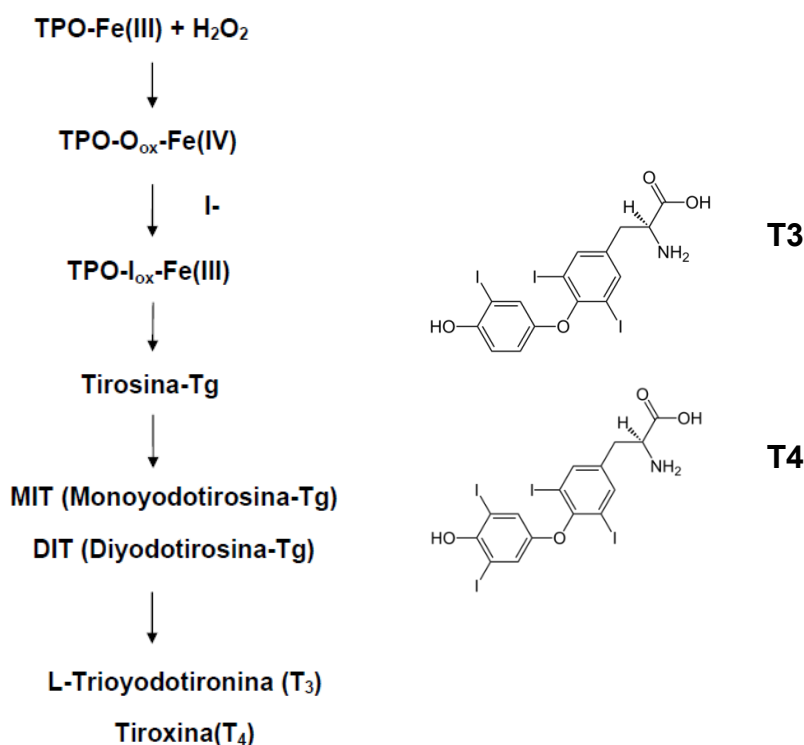


Figura 1. Representación esquemática de la formación de tiroxina (T₄) y triiodotironina (T₃) y de sus estructuras.

¹ A.P Weetman. *N Engl J Med.* **2000.** 343, 1236-1248.

² D.S Cooper. *Lancet* **2003.** 362, 459-468.

³ G. Roy, P.N Jayaram, G. Mugesh. *Chem Asian J.* **2013.** 8, 1910-1921.

Cuando se evalúa el funcionamiento de la tiroides, los resultados de los análisis bioquímicos revelan que los niveles de la hormona tiroestimulante (TSH) son bajos, pero en cambio los de la T3 y T4 son anormalmente altos.

Esta enfermedad se caracteriza por una variedad de signos y síntomas que incluyen pérdida de peso, intolerancia al calor, dificultad para dormir, temblor, aumento en la frecuencia de defecación, debilidad de los músculos proximales, irritabilidad e irregularidad menstrual. Señales incluyen taquicardia, mirada fija, retraso del párpado, proptosis, bocio, temblor en reposo, hiperreflexia y calor, piel húmeda y tersa, trastornos que afectan el estado del ánimo (depresión) ver Figura 2.

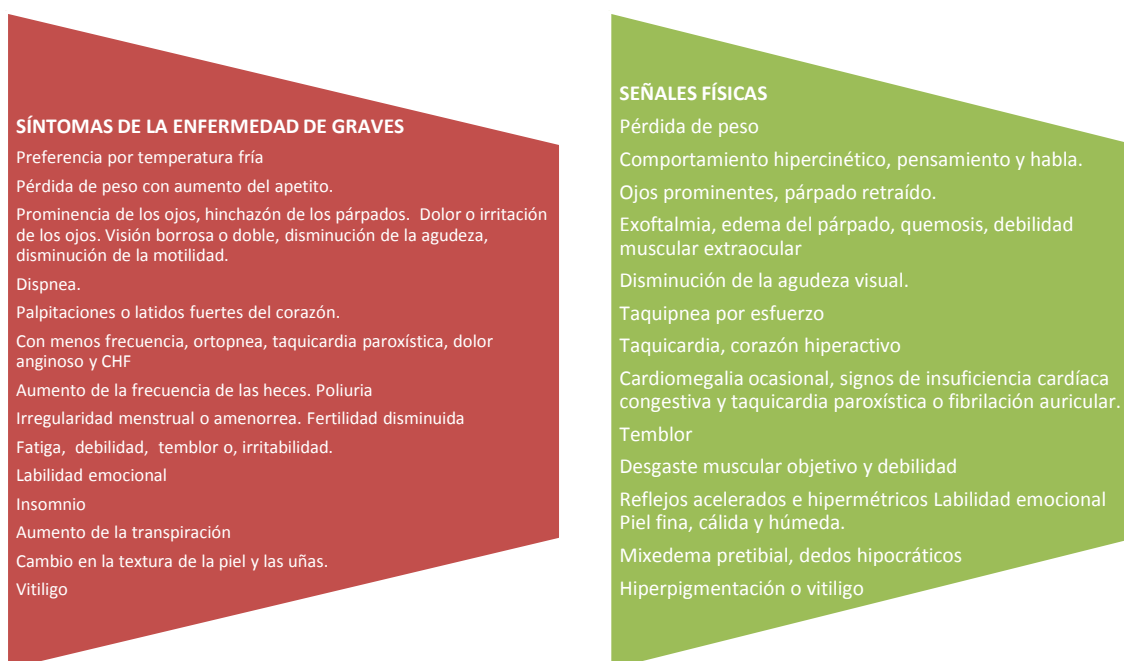


Figura 2. Síntomas y señales físicas más características en la enfermedad de Graves.

La enfermedad de Graves se asocia con una disminución calidad de vida debido tanto a los efectos en el metabolismo por los niveles elevados de hormona tiroidea y de los anticuerpos para el receptor de la TSH.

4.1.1. Tratamiento farmacológico del hipertiroidismo

Para poder tratar esta enfermedad existen tres opciones, cirugía, tratamiento con I^{131} y con medicación antitiroidea.

El tratamiento con fármacos antitiroideos es el que más se usa a largo plazo ya que la gran mayoría de los pacientes tratados logran tener un estado eurotiroideo. En la Figura 3 se muestra de forma esquemática el proceso de biosíntesis de las hormonas tiroideas por medio de la TPO. Como se mencionara anteriormente, en la condición de hipertiroidismo existe exceso de T3 y T4.

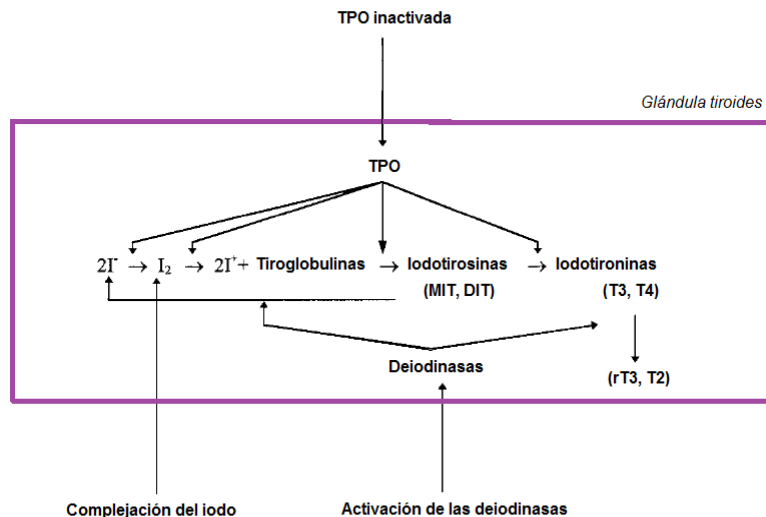


Figura 3. Biosíntesis de hormonas tiroideas por medio de la enzima TPO⁴.

Los fármacos antitiroideos pueden controlar esta sobreproducción de las hormonas tiroideas. Los mecanismos más conocidos son los siguientes (Figura 4): (A) Pueden actuar formando complejos donante-aceptor de electrones muy estables con el iodo molecular de la glándula tiroidea; (B) Por otro lado, pueden hacerlo inhibiendo a la enzima tiroideoperoxidasa (TPO) probablemente coordinándose al centro metálico de la misma, y así resulta inactivada para la síntesis de las hormonas tiroideas o sino también inhibiendo a las iodotironinas desiodinasas 1 y 2 (ID-1 y ID-2), que son las responsables de catalizar la conversión de T4 a T3 (que es la forma biológicamente activa de la hormona tiroidea); (C) eliminando el sustrato agua oxigenada con la finalidad de impedir la formación de la forma oxidada de la TPO.

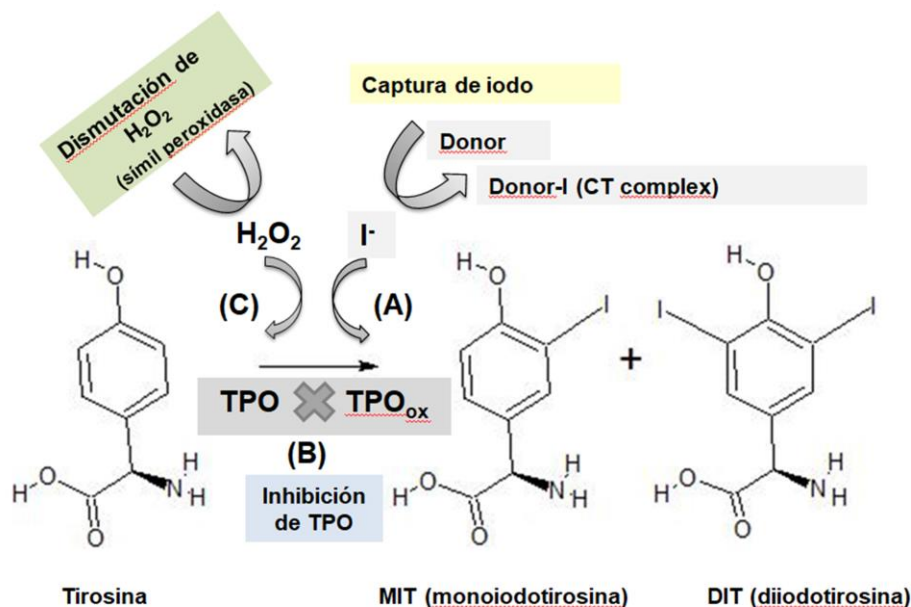


Figura 4. Mecanismos de acción de actividad antitiroidea.

⁴ M-F Sauvage, P. Marquet, A. Rousseau, C. Raby, J. Buxeraud, G. Lachâtre. *Toxicol Applied Pharmacol.* **1998**. 149, 127-135.

Las tionamidas son los fármacos antihipertiroideos que más se administran, específicamente propiltiouracilo (PTU) o metimidazol (MMI), que son los comúnmente utilizados al inicio de la terapia, estos actúan bloqueando la síntesis de hormonas tiroideas⁵. El metimidazol tiene una vida media intratiroides de muchísima mayor duración que el propiltiouracilo, esto permite que pueda administrarse en una sola dosis diaria (en comparación con el PTU, que se administra tres veces por día), y algunos estudios han demostrado que tiene mayor eficacia y menores efectos secundarios.

El Metimidazol puede ejercer su actividad inhibitoria sobre la TPO porque es capaz de poder interactuar con el grupo hemo oxidado de la enzima o bien uniéndose al grupo hemo de la enzima después de la oxidación^{6,7}. Debido al hecho de que estos compuestos poseen la habilidad de formar complejos de transferencia de carga estables con el yodo, es posible impedir la iodación *in vivo*, encontrándose no disponible para unirse al sitio activo de la enzima (Figura 4).

Otro de los mecanismos que se han propuesto se vinculan con el hecho de que la enzima TPO puede ser inhibida porque existe una coordinación competitiva con el átomo de hierro del sitio activo la cual ocurre por medio de la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo N-H del fármaco y el resto histidina de la TPO^{8,9}. Por lo tanto la presencia de un grupo libre N-H es un factor importantísimo para la actividad antitiroidea del metimidazol.

Por otra parte el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un sustrato esencial que ayuda a catalizar la biosíntesis de T3 y T4 por la TPO. Este compuesto es producido mediante las oxidasas DUOX-1 y DUOX-2 dentro de la tiroides. Durante la actividad fisiológica normal, la glándula está expuesta a altas concentraciones de H₂O₂ y también de H₂O₂ derivada de las especies reactivas de oxígeno^{10,11} (EROs).

Se ha reportado que tanto el metimidazol como el PTU pueden inhibir parcialmente la producción de H₂O₂ dependiente de Ca⁺²/NADPH debido a sus propiedades antioxidantes. La inhibición de la biosíntesis de las hormonas tiroideas por el metimidazol *in vivo* puede originarse porque posee un efecto directo sobre la actividad de la TPO y por su habilidad de secuestrar H₂O₂ (Figura 4)^{12,13,14}.

⁵ D.S Cooper. *N Engl J Med*. **2005**. 352, 905-917.

⁶ B. Davidson, M. Soodak, J.T Neary, H.V Strout, J.D Kieffer, H. Mover, F. Maloof. *Endocrinology*. **1978**. 103, 871-883.

⁷ T. Nakashima, A. Taurog, G. Riesco. *Endocrinology*. **1978**. 103, 2187-2197.

⁸ C. Laurence, M.J El Ghomari, M. Berthelot. *J Chem Soc Perkin Trans*. **1998**. 2, 1163-1166.

⁹ C. Laurence, M.J El Ghomari, J.Y Le Questel, M. Berthelot, R. Mokhlisse. *J Chem Soc Perkin Trans*. **1998**. 2, 1545-1551.

¹⁰ C. Schmutzler, B. Mentrup, L. Schomburg, C. Hoang-Vu, V. Herzog, J. Kçhrle. *Biol Chem* **2007**. 388, 1053-1059.

¹¹ J. Aaseth, H. Frey, E. Glatte, G. Norheim, J. Ringstad, Y. Thomassen. *Biol Trace Elem Res*. **1990**. 24, 147-152.

¹² U. Björkman, R. Ekholm. *Endocrinology*. **1992**. 130, 393-399.

¹³ U. Björkman, R. Ekholm. *Mol Cell Endocrinol*. **1995**. 111, 99-107.

¹⁴ R. Ekholm, U. Björkman. *Endocrinology*. **1997**. 138, 2871-2878.

4.1.2. Actividad antitiroidea de fármacos antidepresivos:

Existe evidencia a partir de estudios *in vitro* e *in vivo* que los fármacos antidepresivos exhiben efectos iatrogénicos en la tiroides. De modo que afectan la función de la misma. Estos efectos secundarios pueden surgir de las interacciones en diferentes etapas de la biosíntesis de la hormona tiroidea. Campos-Barros y Baumgartner¹⁵ vincularon de manera hipotética el hecho de que los antidepresivos tricíclicos afectan al eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT), porque son capaces de estimular la actividad de la 5'-deiodinasa en el sistema nervioso central (SNC). Otros estudios *in vitro* enfatizan el hecho que los antidepresivos tricíclicos son capaces de formar complejos con el iodo de modo que no quedaría iodo disponible para la biosíntesis de las hormonas tiroideas, de esta manera pueden inhibir a la peroxidasa tiroidea y se podría bloquear la síntesis de las iodotirosinas y las iodotironinas e inhibir las desiodinasas que catalizan el metabolismo de la hormona tiroidea. Todo esto trae como consecuencia la disminución en sangre de los niveles de hormona tiroidea.

Clínicamente, la función tiroidea y los trastornos afectivos, están estrechamente relacionados. Por un lado, la respuesta terapéutica a los antidepresivos podría estar influenciada por el estado de la tiroides; por otro lado, cuanto mayor sea la disminución de tiroxina inducida por los antidepresivos, mejor es el efecto terapéutico.

Diversos estudios demuestran que muchas drogas tienen como efecto secundario actividad antitiroidea. Existen numerosos compuestos farmacéuticos de distintas categorías terapéuticas y con una amplia diversidad de estructuras químicas, como los tiocianatos, isotiocianatos, tiourea, derivados del imidazol, y varias aminas, para los que se ha evidenciado que pueden formar complejos de transferencia de carga con el iodo. Estudios en paralelo realizados en animales, mediante ensayos de T3 y T4 y estudios histológicos sobre la tiroides, fueron realizados para investigar la acción de estas drogas sobre la enzima TPO. Estos manifestaron resultados interesantes que demuestran la buena correlación que existe entre el valor de K_c (la constante de formación del complejo iodado) y la actividad antitiroidea y dan una idea de la potencialidad que tiene un compuesto para poder donar sus electrones y la capacidad de ejercer actividad antitiroidea *in vivo*¹⁶. Es conocido que los fármacos antidepresivos tricíclicos son considerados buenos agentes antitiroideos porque pueden inhibir la síntesis de las hormonas tiroideas. Esta capacidad ha sido demostrada mediante espectroscopía electrónica UV-visible, porque se han observado la formación de complejos estables de transferencia de carga entre el fármaco antidepresivo y el iodo.

El posible mecanismo por la que ocurre la formación del complejo de TC, ocurre en un proceso que consta de dos etapas (Figura 5).

¹⁵ A. Campos-Barros, A. Baumgartner. *Biol Psychiatry*. **1994**. 35, 214-216.

¹⁶ C. Raby, J-F Lagorce, A-C Jambut-Absil, J. Buxeraud, G. Catanzano. *Endocrinology*. **1990**. 126, 1683-1691.

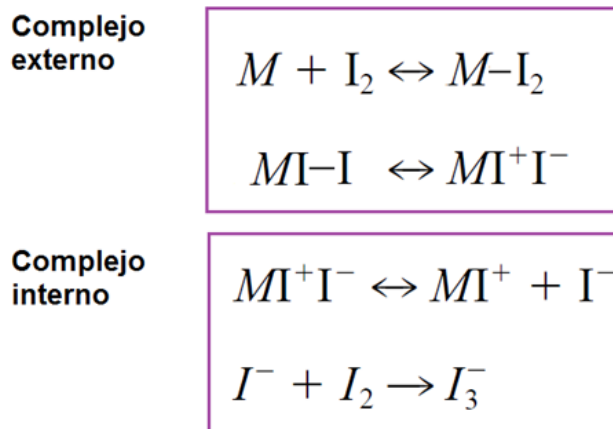


Figura 5. Mecanismo de formación del complejo entre el yodo y algunos fármacos. M es la molécula que posee un grupo donante de electrones.

Una parte del yodo de la tiroides se encuentra complejada por la droga electrodonora. La otra parte se encuentra desactivada como iones triioduro (I_3^-), formado por la combinación de I_2 y I^- originado a partir del complejo interno y que no pudo unirse a la tiroglobulina. Ambos mecanismos logran que el yodo no quede disponible para la síntesis de las hormonas tiroideas y posiblemente sería el mecanismo responsable de los bajos niveles sanguíneos de T3 y T4 una vez administrada la droga¹⁷.

Como se mencionó anteriormente, la capacidad de las moléculas para poder formar complejos con el yodo puede explicarse analizando la estructura química de estas drogas ya que poseen grupos electrodonadores. Moléculas que contengan átomos de nitrógeno, oxígeno y sulfuro y que presenten un par de electrones disponibles puede formar complejos de transferencia de carga con el yodo^{18,19}.

4.1.3. Actividad antitiroidea para el complejo $(SerH_2)_2[CuCl_4]$

En trabajos anteriores del grupo de investigación se ha demostrado que el fármaco sertralina es capaz de capturar yodo mediante la formación de un complejo de transferencia de carga (TC). Esta capacidad de formar complejos de TC, resulta ser un indicio de que un compuesto puede potencialmente actuar como un agente antitiroideo. Cuando el clorhidrato de sertralina se estudia en presencia de solución de yodo, aparece una nueva banda de TC localizada en 257 nm. La aplicación del método de Lang (descrito en la parte experimental) sobre los datos experimentales da lugar al cálculo de un valor de constante formación de complejo K_c de $3277,48 \text{ M}^{-1}$. Este valor sería indicativo

¹⁷ J. Buxeraud, A.C Absil, J. Claude, C. Raby, G. Catanzano, C. Beck. *Eur J Med-Chim Ther.* **1985**. 20(1), 43-51.

¹⁸ J. Buxeraud, A.C Absil, C. Raby. *J Pharmacol Sci.* **1984**. 73(12), 1687-1690.

¹⁹ J.F Lagorce, F. Comby, A. Rousseau, J. Buxeraud, C. Raby. *Chem Pharm Bulletin.* **1993**. 41, 1258-1260.

de que el compuesto posee una fuerte actividad antitiroidea, si se compara con el valor que se tiene de referencia²⁰ $K_c = 100,00 \text{ M}^{-1}$.

En el trabajo de esta tesis, el agregado secuencial de concentraciones de iodo (1×10^{-4} - $4 \times 10^{-5} \text{ M}$), a una solución de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ ($4 \times 10^{-4} \text{ M}$) produce una disminución de la intensidad de la banda del iodo mientras que no se observa una banda nueva de TC (Figura 6).

Esto podría deberse al hecho de que complejo no posea la habilidad de capturar al iodo sino que estaría actuando como un catalizador promoviendo su desaparición.

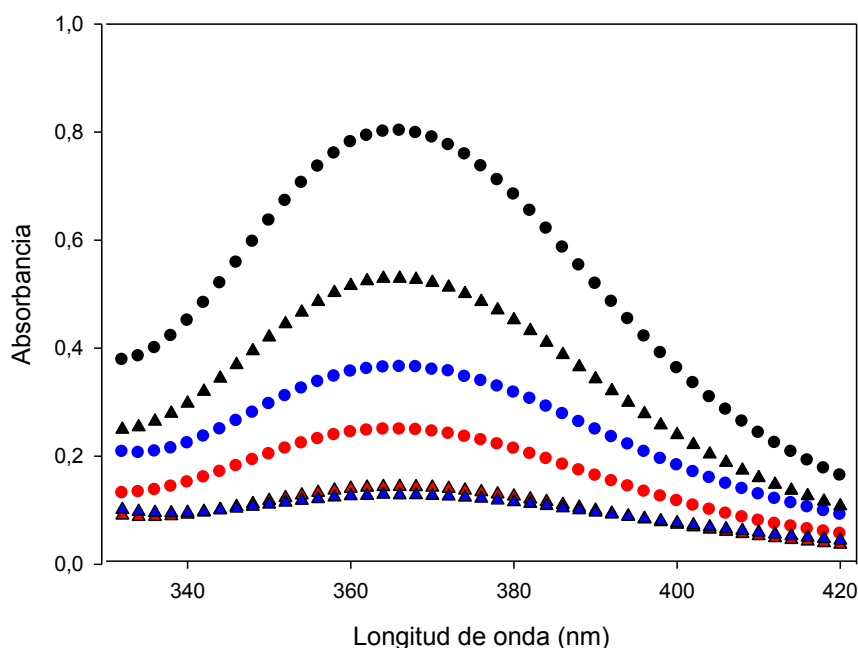


Figura 6. Método de Lang: Espectro de absorción electrónica entre 300-440 nm para (•) I_2 (4×10^{-5} - $1 \times 10^{-4} \text{ M}$), (•) I_2 ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$) y (•) I_2 ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$) y sistemas de I_2 con $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$: (▲) I_2 (10^{-4} M)- $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (10^{-4} M), (▲) I_2 ($6 \times 10^{-5} \text{ M}$)- $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (10^{-4} M) y (▲) I_2 ($4 \times 10^{-5} \text{ M}$)- $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (10^{-4} M).

Existen muchísimas sustancias que poseen un grupo N-H libre y que pueden formar complejos de TC con el iodo, y por ese motivo se ha propuesto que este tipo de compuestos pueden actuar también como inhibidores de la TPO.

Aunque el mecanismo de acción de los fármacos antitiroideos no está aún del todo claro, muchas investigaciones sugieren como se mencionó arriba, que pueden coordinarse de forma competitiva con el centro metálico de hierro de la TPO inactivándola, esto ocurriría porque se formaría un enlace de hidrógeno con el grupo N-H²¹.

²⁰ G.E Escudero, V. Ferraresi Curotto, C.H Laino, R. Pis Diez, P.A.M Williams, E.G Ferrer, *Spectrochim. Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2013.** 104, 271-279.

²¹ G. Roy, P.N Jayaram, G. Mugesh. *Chem Asian J.* **2013.** 1910-1921.

En nuestros experimentos, se utilizó la enzima lactoperoxidasa bovina (LPO) debido a que es considerada estructuralmente similar a la TPO y de más fácil acceso.

Cuando se testeó el clorhidrato de sertralina con la enzima LPO se observó en primer lugar que producía inhibición y que la inhibición producida era dependiente de la dosis utilizada del complejo (Figura 7). El valor calculado para el IC_{50} es de 80 μ M. Este valor, por ejemplo, es muchísimo más bajo que los reportados para otros antidepresivos. Vale la pena aclarar que la enzima que se usó para determinar la actividad antitiroidea de otros antidepresivos (desipramina, imipramina y cloropramina) fue la peroxidasa de rábano²², es por ello que no puede hacerse una comparación directa de nuestro dato experimental con esos valores. Sin embargo los valores de IC_{50} que se reportaron para estos fármacos se encuentran entre 3,7 y 0,81 mM.

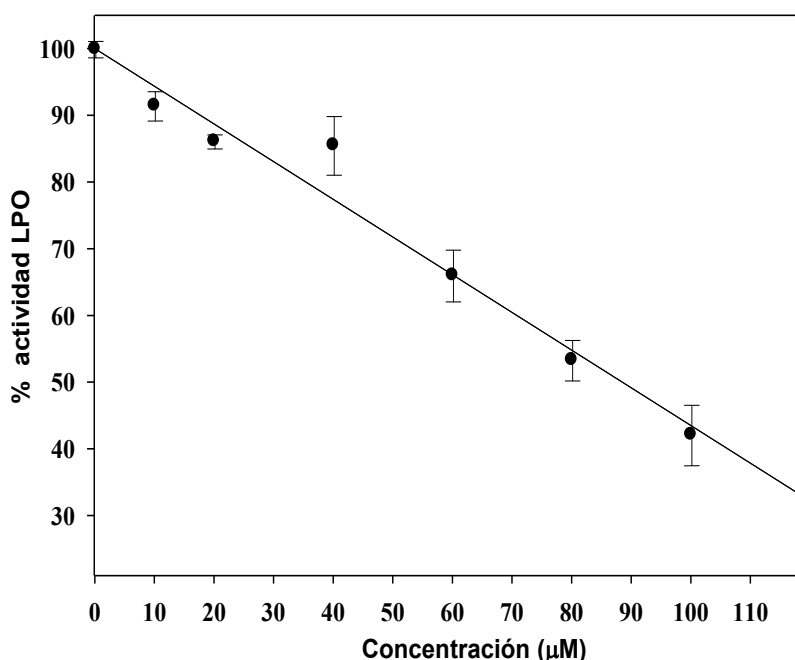


Figura 7. Curva de inhibición de sertralina en la oxidación catalítica del ABTS por la enzima LPO (ver sección experimental).

Una de las observaciones experimentales que se puede destacar es el comportamiento dual mostrado por sertralina ya que por un lado actúa capturando al iodo y por otro inhibiendo a la enzima LPO, por tanto además de su actividad reconocida como antidepresivo se puede proponer como un buen agente antitiroideo.

Por otra parte el $(SerH_2)_2[CuCl_4]$ no fue capaz de inhibir a la enzima LPO, en consecuencia esto indicaría que la sertralina pierde la capacidad de inactivar a la enzima cuando se forma el nuevo compuesto. Posiblemente esto se deba a

²² A. Rousseau, F. Comby, J. Buxeraud, C. Raby. *Biol Pharm Bull.* **1996.** 19, 726-728.

que el compuesto estudiado tenga un tamaño mucho más grande del permitido para poder acceder al grupo hemo del sitio activo de la LPO²³.

4.1.4. Actividad antitiroidea para el complejo $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$

Como se mencionó anteriormente, los antidepresivos también pueden actuar como fármacos antitiroideos debido a la presencia de grupos donadores de electrones (átomos de oxígeno, azufre y nitrógeno) en sus moléculas²⁴, que pueden formar complejos de transferencia de carga con el yodo, bloqueando la iodación o inhibiendo la enzima TPO.

Teniendo en cuenta la estructura química del ligando y del complejo y la presencia de grupos químicos capaces de interactuar con el yodo (grupos NH y átomos de oxígeno) se ha evaluado la capacidad de formar un complejo de transferencia de carga con este elemento y también el posible efecto inhibitorio sobre la LPO. En el caso de la formación del complejo TC, el valor de su constante de formación se puede asumir como un criterio para la evaluación de la actividad potencial antitiroidea²⁵.

Las determinaciones realizadas sugieren que no se detecta interacción con yodo para el ligando en las condiciones experimentales empleadas. Vale la pena mencionar que, para este experimento ni el ligando ni el complejo $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ presentan una banda de absorción en el rango de longitud de onda utilizado que pueda interferir sobre la banda que se utiliza de referencia. Las características espectrales del complejo de TC entre $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ y el I_2 mostraron que el incremento progresivo de las concentraciones de $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ produce un incremento en la absorbancia de la banda a 363 nm (Figura 8).

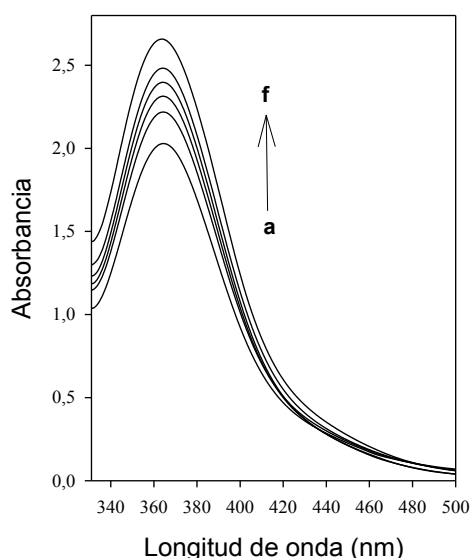


Figura 8. Método de Lang: Espectro de absorción electrónica UV-vis entre 330-500 nm para el sistema $\text{I}_2\text{-Mg}(\text{DL-pGlu})_2$. $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ ($a = 1 \times 10^{-4}$ M, $b = 2 \times 10^{-4}$ M, $c = 4 \times 10^{-4}$ M, $d = 6 \times 10^{-4}$ M, $e = 8 \times 10^{-4}$ M, $f = 1 \times 10^{-4}$ M, soluciones DMF-agua 10:1) con yodo (2×10^{-4} M, etanol) a 298 K, 1 cm de camino óptico.

²³ S. Sharma, A.K Singh, S. Kaushik, M. Sinha, R.P Singh, P. Sharma, H. Sirohi, P. Kaur, T. Singh. *Int J Biochem Mol Biol.* **2013.** 4, 108-128.

²⁴ A. Rousseau, F. Comby, J. Buxeraud, C.Raby. *Biol Pharm Bull.* **1996.** 19, 726-728.

²⁵ J.F Lagorce, A.C Jambut-Absil, J. Buxeraud. *Chem Phar Bull.* **1990.** 38, 2172-2174.

Esta banda indica que se ha formado un complejo con el iodo molecular. Si se revisa la literatura, se encuentra mucha información relacionada al hecho de que el iodo produce diversos complejos moleculares con una relación 1:1, con una variedad de compuestos, en diferentes tipos de solventes²⁶. El complejo metálico del presente estudio también presenta grupos NH libres capaces de interactuar con el iodo.

Para la evaluación de la potencial actividad antitiroidea del compuesto se aplicó el método de Lang a los datos experimentales (Figura 9).

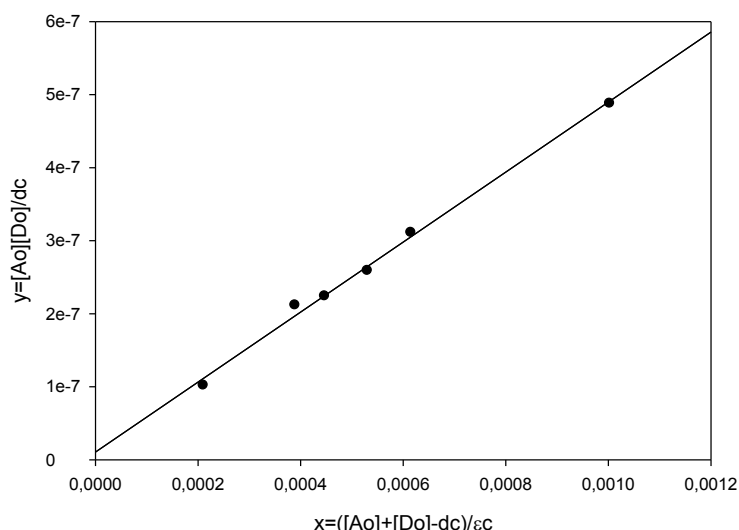


Figura 9. Método de Lang: relación entre $Y = [A_0][D_0]/dc$ vs $X = ([A_0] + [D_0] - dc)/\epsilon c$. La reacción se llevó a cabo directamente en la celda del espectrofotómetro mezclando soluciones de 1,5 ml de cada compuesto: donante y el aceptor (iodo).

Como se mencionó en la sección experimental se puede calcular la constante de formación del complejo de transferencia de carga K_c y el coeficiente de extinción molar (ϵc) para aquellos complejos de transferencia de carga formados en una relación estequiométrica 1:1 bajo la longitud de onda en análisis, graficando:

$$[A_0][D_0]/dc = ([A_0] + [D_0] - dc/\epsilon c) / \epsilon c + 1/(K_c \epsilon c)$$

A_0 y D_0 son las concentraciones iniciales del aceptor (iodo) y el donador (compuesto en estudio) respectivamente, dc representa la absorbancia. Reformulando la ecuación anterior se llega a:

$$Y = (1/\epsilon c)X + 1/(K_c \epsilon c)$$

Donde $Y = [A_0][D_0]/dc$ and $X = [A_0] + [D_0] - dc/\epsilon c$

²⁶ U.M Rabie, H.M Abou-El Wafa, H. Nassar. *Spectrochim Acta Part A*. **2011**. 78, 512-517.

A partir de la gráfica se obtiene una línea recta con pendiente $1/\epsilon c$ y ordenada al origen de $1/(Kc\epsilon c)$. Para resolver esta ecuación se utiliza un método de iteración y de regresión lineal.

Así se pudo determinar la constante de formación $Kc = 45366,5 \pm 29 \text{ M}^{-1}$ ($\Delta G^0 = -26,55 \text{ KJ/mol}$) y el coeficiente de extinción molar del complejo de TC, $\epsilon = 2079,5 \pm 25 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Se sabe que los compuestos con un valor de Kc superior a 100 M^{-1} presentan actividad antitiroidea y que por lo tanto, dicho compuesto puede considerarse como un posible agente antitiroideo. Como se muestra, la constante Kc obtenida supera este valor y se puede sugerir que el compuesto puede comportarse como un agente antihipertiroideo. Por otra parte, el valor de ΔG^0 es negativo y este hecho revela que la formación del complejo TC es un proceso espontáneo.

Si se busca el fundamento químico, se podría proponer que esta actividad proviene de los grupos NH no coordinados como se ha demostrado previamente para otras moléculas que contienen N. Éstas poseen valores de constante que son menores, mayores o al menos del mismo orden de magnitud. Debido a que el tipo de disolvente afecta el valor de Kc , no se pudo realizar una comparación directa con estas otras moléculas. Por ejemplo, el metimidazol medido en CCl_4 o en mezcla de solventes (etanol: H_2O) tiene un valor Kc del mismo orden de magnitud²⁷.

En relación a las determinaciones de las inhibiciones de la enzima lactoperoxidasa puede mencionarse que desafortunadamente ninguno de los compuestos mostró capacidad inhibidora sobre la misma.

4.1.5. Actividad antitiroidea del DMA y MgDMA

Para poder evaluar la posibilidad que el ligando o el complejo de magnesio puedan actuar como potenciales agentes antitiroideos mediante la formación de complejos de transferencia de carga (TC), se llevaron a cabo dos experimentos. En el primer ensayo realizado se determinó cuál es la estequiometría del presunto complejo formado con el iodo en solución; para ello se usa el método de la razón molar, en donde se obtuvieron los espectros de absorbancia para rangos de concentraciones en el orden de 10^{-3} - 10^{-5} M . Los resultados pueden observarse en el gráfico de la Figura 10. Del análisis de la curva se concluye que la relación estequiométrica existente para el complejo formado de TC [DMA]- $[\text{I}_2]$ es 1:1.

²⁷ N.M Urquiza, M.S Islas, S.T Ariza, N. Jori, J.J Martinez Medina, M.J Lavecchia, L.L Lopez Tevez, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Chem-Biol Interact.* **2015.** 229, 64-72.

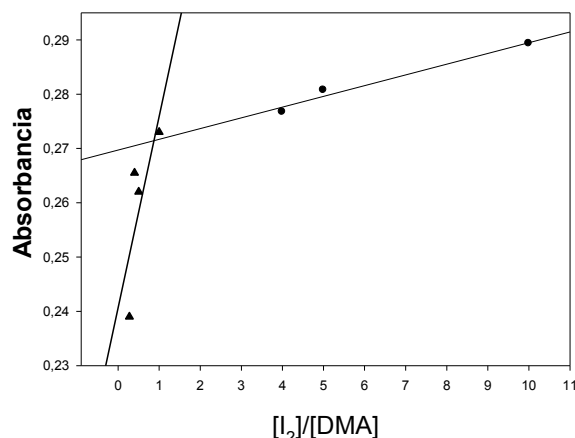


Figura 10. Método de la razón molar para complejo de TC [DMA]-[I₂]. Absorbancia vs [I₂] / [DMA]. Concentraciones de DMA 4×10^{-5} M a 1×10^{-3} M (en CCl₄), el yodo permanece constante 4×10^{-4} M (en CCl₄).

El otro experimento se realizó con la finalidad de poder observar en mejor detalle la formación del complejo de TC entre el yodo y el ligando, para ello se usó un rango de concentración más alto de DMA (0,1 M-0,3 M) Figura 11.

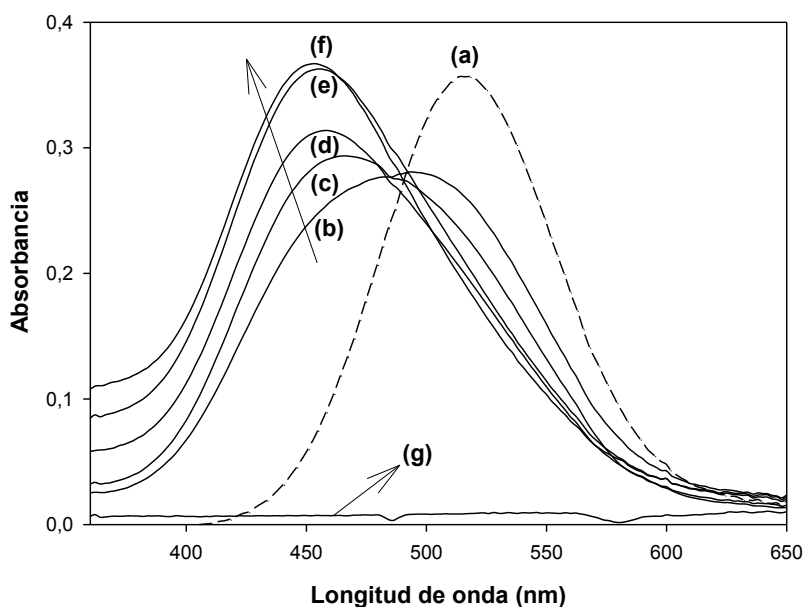


Figura 11. Espectro de absorbancia UV-vis entre 350-650 nm para el complejo de TC de [DMA]-[I₂]. La concentración de yodo permanece fija. (a) [I₂] = 4×10^{-4} M (en CCl₄). Sistema de DMA-I₂, donde las concentraciones de DMA en CCl₄ son b = 0,1 M; c = 0,15 M; d = 0,2 M; e = 0,25 M; f = 0,3 M y g = DMA 0,25 M.

Cuando la solución de yodo, de color rosa intenso, es añadida a las distintas concentraciones de ligando, se observa que esta vira rápidamente hacia el color amarillo (Figura 12), debido a la complejación con el yodo.

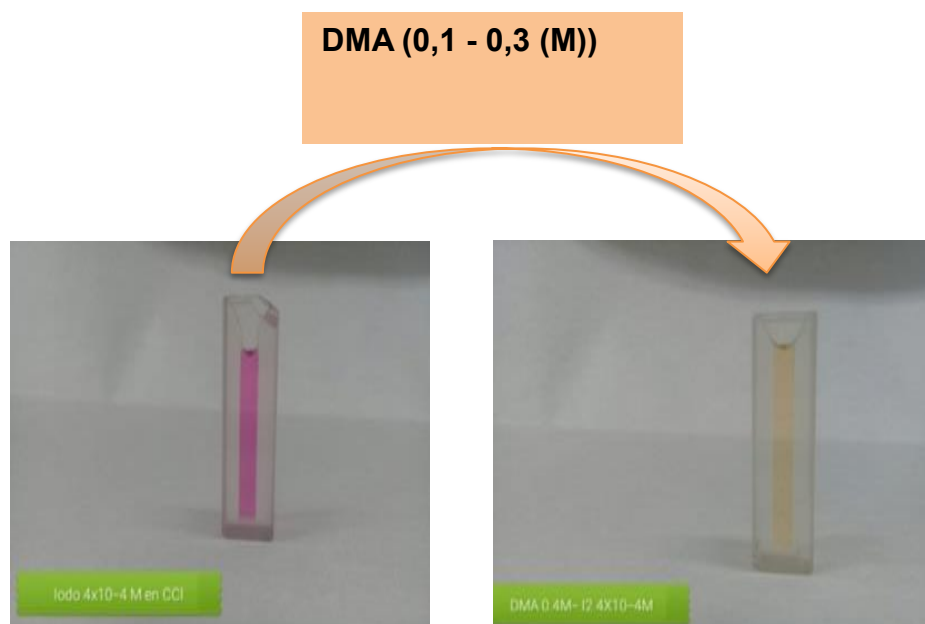


Figura 12. Cambio de color por la formación de complejos de TC DMA-I₂.

El espectro de absorción UV-vis para los compuestos formados con el I₂ se registraron en la región entre 360-650 nm (Figura 11). Para la DMA sola se observa que no hay absorción en la región de estudio, pero el I₂ muestra una banda típica localizada en 515 nm. Como puede analizarse de la observación de la curva, el agregado secuencial de la solución de I₂ a concentraciones crecientes de DMA, produce la desaparición de la banda del I₂, con un desplazamiento de la curva hacia la zona de mayor energía del espectro resultando evidente la formación de un complejo de TC. La intensidad de esta nueva banda va en aumento paralelamente al incremento de la concentración del ligando, y se observa un punto isobéstico formado entre el sistema I₂-DMA con la banda del yodo. Esto es indicativo de que existen en el equilibrio el complejo de TC con la DMA bajo las condiciones experimentales empleadas. El desplazamiento hacia el azul de la banda de yodo libre se postula que pueda deberse a una perturbación del orbital molecular (σ^*) por una interacción repulsiva entre el yodo bimolecular cuando se forma el complejo de TC²⁸.

Los datos obtenidos a partir de la ecuación modificada de Benesi-Hildebrand (ver Figura 13) permitieron obtener distintos parámetros para el sistema en estudio y pueden apreciarse en la Tabla 1 junto con los datos de la energía de la transferencia de carga y el cambio de energía libre para el complejo de TC. Estos datos indican la naturaleza espontánea del proceso de complejación.

²⁸ U.M Rabie, M.H.M Abou-El-Wafa, H. Nassar. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2011**. 78, 512-517.

Tabla 1. Valores de constante de formación (K_C), coeficiente de extinción molar (ϵ) y cambio de energía libre estandar para el complejo DMA-iodo.

	λ_{\max} (nm)	K_C (M^{-1})	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	E_{CT} (eV)	ΔG^0 (KJ.mol $^{-1}$)
[DMA]:[I $_2$] (complejo TC)	453	12479	1223,4	2,75	-23,37

Para que un compuesto sea considerado como un potencial agente antitiroideo el valor de constante del complejo de TC, K_C , debe ser superior a 100 L x mol $^{-1}$. El sistema analizado, DMA-I $_2$, posee un valor de K_C que es 124,8 veces superior al de referencia, por lo tanto la DMA puede considerarse como un potencial agente antitiroideo.

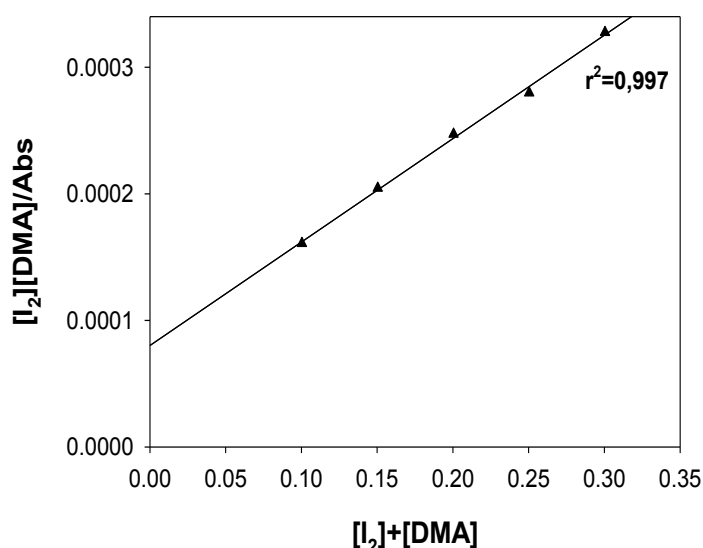


Figura 13. Curva $[D_0] \times [A_0] \times l / \Delta$ vs $[D_0] + [A_0] / \epsilon$ del complejo de transferencia de carga DMA-I $_2$ a 453 nm.

Para poder obtener información relacionada con los grupos funcionales que estarían participando de la interacción con el iodo, se midieron los espectros FTIR de las soluciones previamente analizadas. En la Figura 14 se muestran para tres concentraciones seleccionadas los diferentes rangos en cm $^{-1}$ en el cual se destacan cuales fueron las modificaciones que pudieron ser observadas. Los principales cambios surgen en la banda de 1657 cm $^{-1}$ correspondiente a los modos vibracionales $\nu C=O + \nu C-N$ para la DMA. Cuando hay interacción con el I $_2$, esta banda se desdobla, una aparece a 1660 cm $^{-1}$ y la otra surge como un hombro a 1650 cm $^{-1}$. Este desdoblamiento de la banda sumado al aumento en la intensidad de las bandas ubicadas en 1354 cm $^{-1}$ y 1395 cm $^{-1}$, sugieren que la interacción involucra al grupo carbonilo de la DMA.

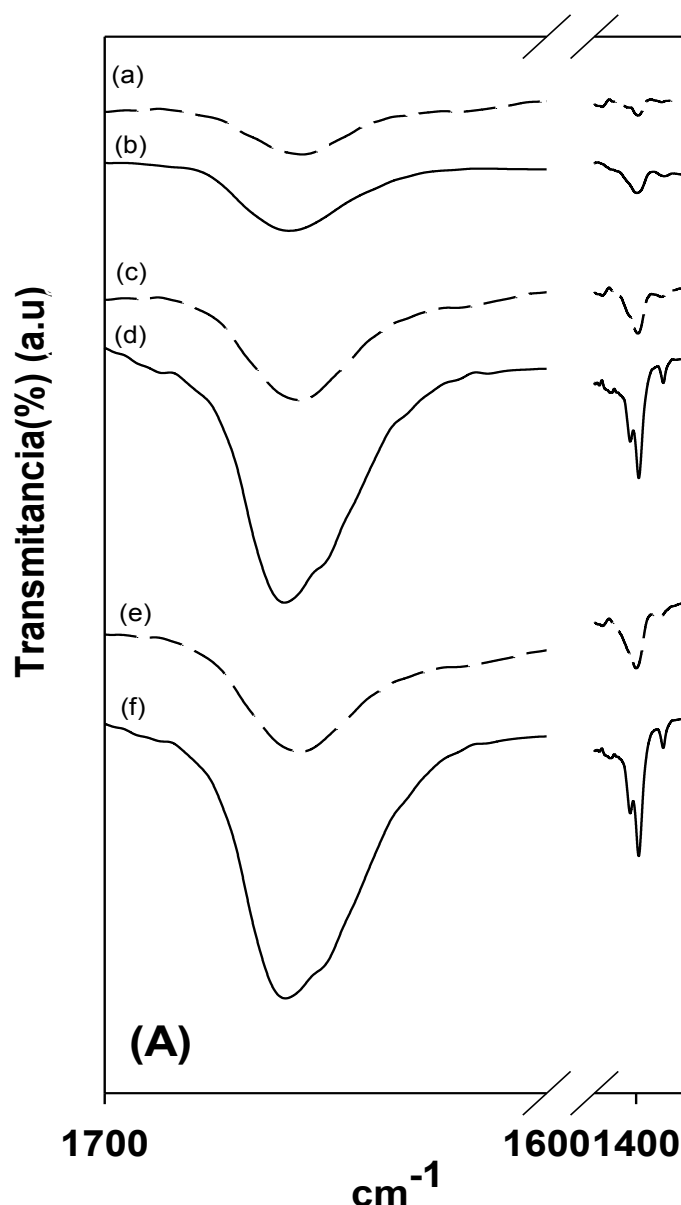


Figura 14. Espectros FTIR de las soluciones de los sistemas DMA-I₂ (CCl₄): (a) [DMA] = 0,15M, (b) [I₂] = 4 x 10⁻⁴ M: [DMA] = 0,15M; (c) [DMA] = 0,25 M, (d) [I₂] = 4x10⁻⁴ M: [DMA]= 0,25 M; (e) [DMA] = 0,3 M, (f) [I₂] = 4 x 10⁻⁴ M: [DMA]=0,3 M.

Cuando se hizo el mismo análisis para el complejo de MgDMA con el I₂, las interacciones parecen ser diferentes.

Para ver la posibilidad de que haya interacción con el I₂, se analizaron tres juegos de experimentos donde se fue variando el rango concentraciones del [Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂.2H₂O: 0,01 M - 0,05 M, 1 x10⁻³ M -1 x10⁻² M y 1 x 10⁻³ M - 4 x 10⁻⁵ M utilizando dimetilformamida como solvente.

Se puede concluir que a partir de las curvas de absorción para todo el rango de concentraciones utilizadas hay interacción entre el yodo y el complejo MgDMA. En todos los ensayos realizados la estequiometría entre el complejo metálico y el yodo es 1:2 (M/L) (Figura 15).

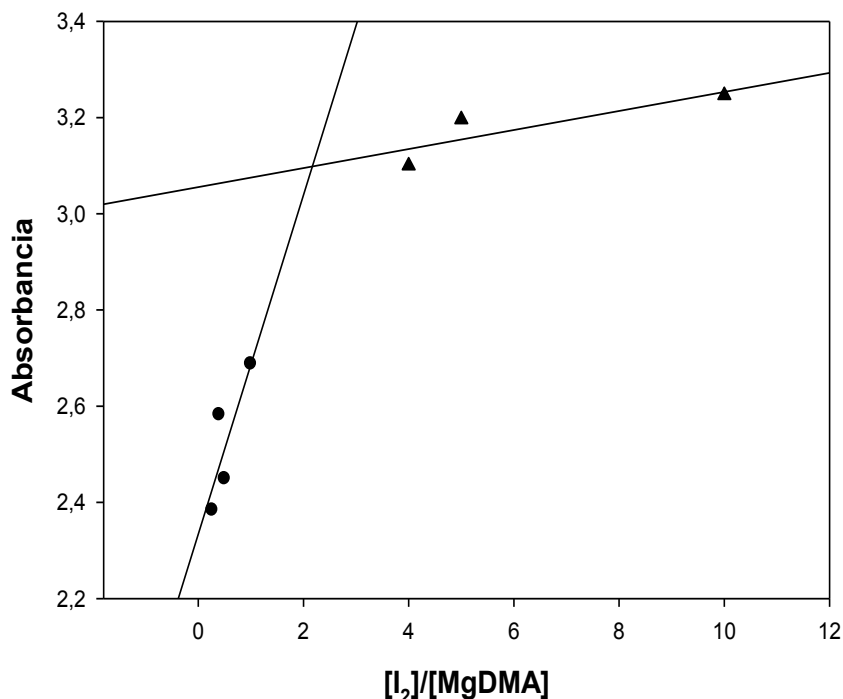


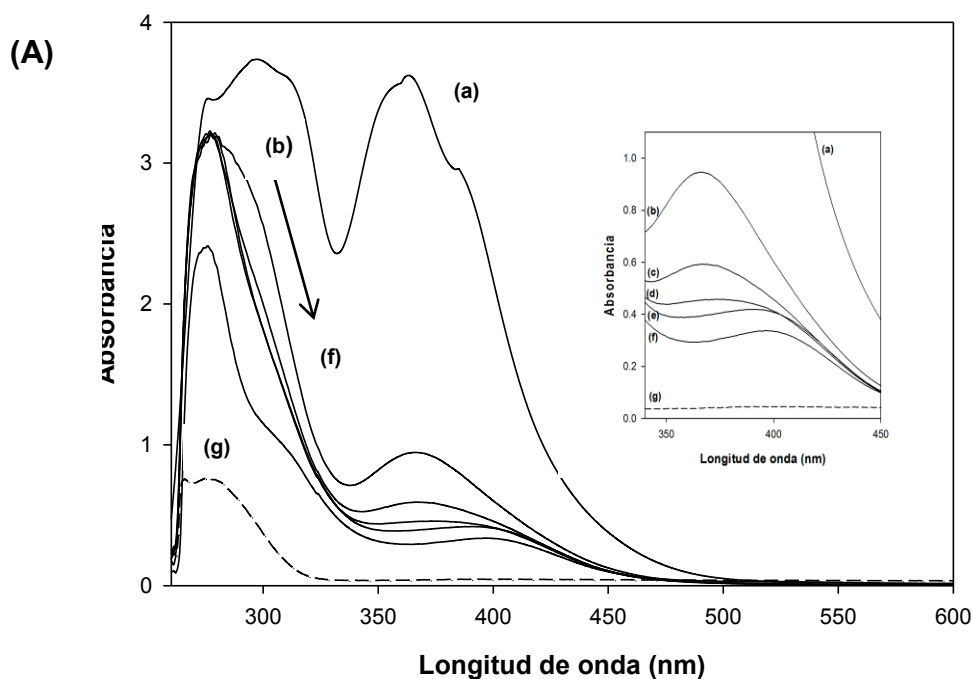
Figura 15. Curva de relación molar. Absorbancia (365 nm) vs $[I_2]/[MgDMA]$ ($[I_2] = 4 \times 10^{-4}$ M, $[MgDMA] = 4 \times 10^{-5}$ M- $1,5 \times 10^{-3}$ M).

Como puede verse en el espectro UV-Vis, para el rango más alto de concentración (Figura 16A) la interacción fue más pronunciada y se observó la disminución y desplazamiento de la banda de iodo ubicada a 365 nm.

La interacción produjo la decoloración de la solución de amarilla del iodo a una solución incolora del sistema en estudio (Figura 16B). Además se puede observar que la absorción del complejo de MgDMA (Figura 16A (g)) no perturbó las modificaciones de la banda de iodo que condujeron a que las bandas características del ion triioduro (I_3^-) a 280 nm y 370 nm de forma tal que la banda con menor energía se desplaza finalmente en 397 nm. Analizando todas las posibilidades y considerando que en el complejo de magnesio con la N,N-dimetilacetamida el ligando esté cargado positivamente sobre el átomo de nitrógeno, la explicación de este comportamiento podría deberse a la formación de la sal por transferencia de electrones²⁹. Esto explicaría la formación de las especies en solución con una relación estequiométrica 1: 2 $Mg(DMA)^{2+}$: 2(I_3^-), que es el que se obtuvo en el rango más bajo de concentración.

Cuando se analizaron las soluciones mediante espectroscopía FTIR no se observaron cambios substanciales de los espectros del complejo metálico MgDMA en relación al sistema generado entre el MgDMA- I_2 . Asumimos que el iodo en su forma aniónica interactúa de forma similar al cloro. Estas observaciones concuerdan con lo observado en los espectros UV-vis.

²⁹ U.M Rabie, H.M.A Salman, M.H.M Abou-El-Wafa. *Bull Chem Soc Jpn.* **2004.** 77, 681-686.



(B)

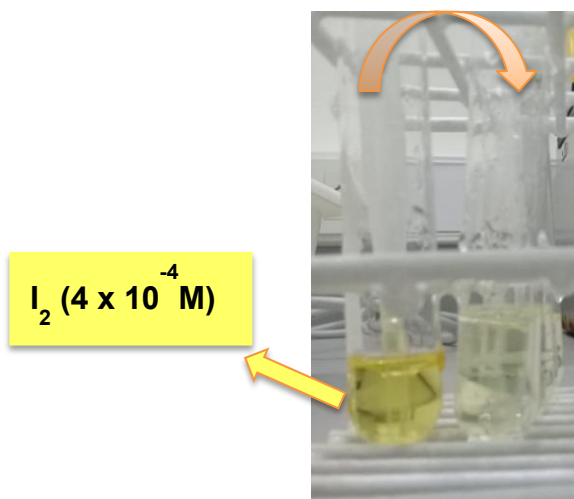
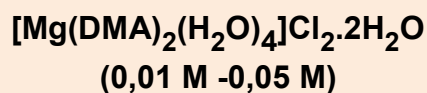


Figura 16. (A). Espectro de absorción electrónica de (a) $[\text{I}_2] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$, (b) $[\text{I}_2] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}/[\text{MgDMA}] = 0,01\text{M}$; (c) $[\text{I}_2] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}/[\text{MgDMA}] = 0,02\text{M}$, (d) $[\text{I}_2] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}/[\text{MgDMA}] = 0,03\text{M}$, (e) $[\text{I}_2] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}/[\text{MgDMA}] = 0,04\text{M}$, (f) $[\text{I}_2] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}/[\text{MgDMA}] = 0,05\text{M}$ y (g) $[\text{MgDMA}] = 0,05 \text{ M}$. Solvente = DMF (Inset = vista ampliada de las modificaciones de las bandas). **(B).** Cambio de color por la formación de complejos de TC MgDMA- I_2 (DMF).

4.2. Actividad antioxidante

Desde un punto de vista bioquímico, una reacción oxidativa es aquella en la que ocurre una pérdida de electrones, de modo que existe una cesión de hidrógeno o una captación de oxígeno. Siempre que se produce, se acompaña de una reacción de reducción de otra molécula de modo que se dan en el contexto de una reacción de óxido-reducción, fundamental para la obtención de energía libre que se podrá almacenar en forma de ATP.

Los procesos metabólicos fisiológicos conducen a la producción de grandes cantidades de especies oxidantes o radicales libres (RL) que tienen un electrón desapareado por lo que son muy reactivas, de modo que tienden a sustraer un electrón de otras moléculas estables que los rodean con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Al producirse esta reacción, la molécula estable que ha cedido el electrón se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que conduce al daño de macromoléculas (lípidos, proteínas e hidratos de carbono) con el consiguiente daño fisiológico-metabólico (funcionalidad de membranas, respiración celular, inducción génica, etc.). Por ejemplo el anión superóxido puede reaccionar con otras moléculas de radicales como el óxido nítrico para producir especies reactivas de nitrógeno (ERNs), produciendo así más radicales libres.

Para neutralizar la actividad y las consecuencias de los RL (anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno), existen mecanismos de defensas compuestos por sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y la catalasa de los peroxisomas fundamentalmente) y no enzimáticos (glutatión, vitaminas A y E) que nos permiten alcanzar el equilibrio perfecto del estado redox.

Aunque los RL no son intrínsecamente nocivos (nuestro organismo los sintetiza en cantidades moderadas para luchar contra agentes patógenos) cuando se produce un exceso de estos, se rompe el equilibrio produciéndose el llamado estrés oxidativo (EO).

Últimamente existe un marcado interés en nuevas sustancias con actividad antioxidante. La razón principal es poder brindar protección a las células (organelas, membranas celulares y las vías metabólicas) contra los radicales libres de oxígeno y sus derivados reactivos conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas especies generan estados de inflamación crónica y otras enfermedades asociadas con el estrés oxidativo³⁰.

4.2.1. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

La producción de radicales libres, o especies reactivas de oxígeno (EROs), es un proceso normal en el metabolismo aeróbico y las EROs desempeñan una serie de funciones fisiológicas. Actúan como mensajeros secundarios críticos y

³⁰ M. Majewska, M. Skrzycki, M.G Podsiad, H. Czeczot. *Acta Pol Pharm Drug Res.* **2011.** 68, 611-615.

elementos esenciales de los procesos neurobiológicos fundamentales como el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular³¹, señalización, migración y adhesión³², respuesta inmune, síntesis biológica, regulación de la expresión génica³³ y formas reguladas de muerte celular³⁴.

Las EROs son considerados convencionalmente como subproductos tóxicos por los efectos perjudiciales que ocasionan biológicamente. Estos son generados por la descomposición imparcial del oxígeno durante el metabolismo mitocondrial (cadena de transporte de electrones), la cascada de fosforilación oxidativa en las células y también durante los períodos de estrés ambiental, exposición a los rayos UV o al calor.

Sin embargo cuando las EROs se encuentran en exceso afectan a distintas biomoléculas como lípidos (peroxidación lipídica), proteínas (oxidación de aminoácidos), ADN y enzimas (oxidación de cofactores), causando varios daños que finalmente puede provocar la muerte celular y también la aparición de diversas enfermedades. Como se ha demostrado que juega un papel en la fisiopatología de, entre otras, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer, enfermedad de Alzheimer³⁵, entre otras (Figura 17).

El estrés oxidativo es un desbalance entre la producción de radicales libres y metabolitos reactivos (oxidantes) y su eliminación por mecanismos protectores (antioxidantes), es decir, este estado se traduce en un aumento de la producción de oxidantes o una disminución en la producción de antioxidantes.

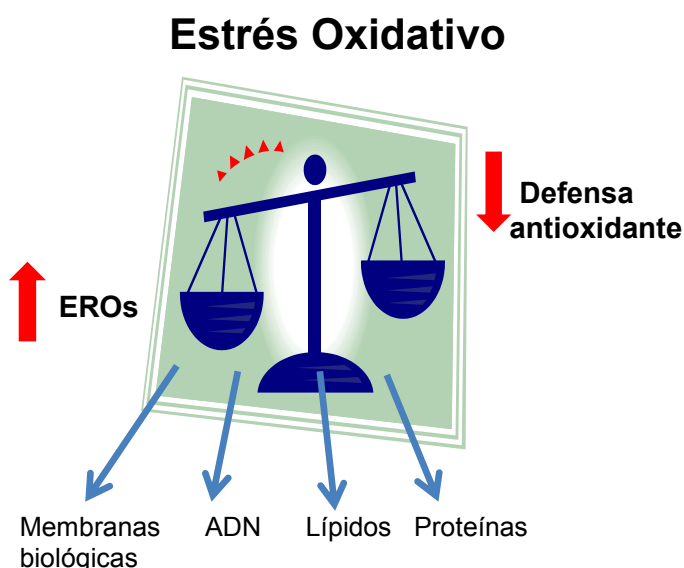


Figura 17. Una mayor producción de EROs y la inactivación o el consumo excesivo de defensas antioxidantes serán responsables del daño oxidativo de las membranas y moléculas biológicas, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

³¹ H. Sauer, M. Wartenberg, J. Hescheler. *Cell Physiol Biochem.* **2001.** 11, 173-186.

³² T.R Hurd, M. DeGennaro, R. Lehmann. *Trends Cell Biol.* **2012.** 22, 107-115.

³³ J.I Oh, S. Kaplan. *EMBO J.* **2000.** 19(42), 37-47.

³⁴ P.D Ray, B-W. Huang, Y.Tsuji. *Cell Signal.* **2012.** 24, 981-990.

³⁵ M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D Cronin, M. Mazur, J. Telser. *J Biochem Cell Biol.* **2007.** 39(1), 44-84.

El daño incluye modificación oxidativa de macromoléculas, muerte celular por necrosis o apoptosis, lesión estructural de tejidos, etc. Particularmente lípidos, proteínas y ADN son moléculas “blanco” para el mecanismo de oxidación. Las modificaciones en el ADN pueden conducir a mutaciones, rupturas de doble o simple cadena y eventualmente a muerte celular. Además, las oxidaciones en las proteínas conducen a un funcionamiento defectuoso de enzimas, las cuales son incapaces de cumplir con sus funciones. Por su parte los lípidos, que son constituyentes importantes de las membranas celulares y los ácidos grasos insaturados, son fácilmente oxidados pudiendo comenzar una cadena de reacciones que conducen a comprometer la integridad celular.

4.2.2. Mecanismos de defensa frente al daño oxidativo

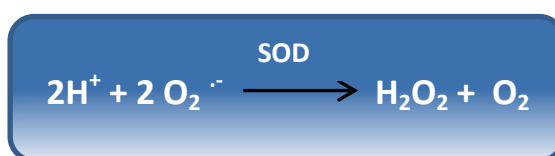
4.2.2.1. Enzima superóxido dismutasa (SOD)

La exposición continua a diversos tipos de estrés oxidativo provenientes de diferentes fuentes conduce a las células y al organismo entero a desarrollar mecanismos de defensa para la protección contra metabolitos reactivos. Uno de estos mecanismos de acción directa está constituido por la enzima superóxido dismutasa (SOD).

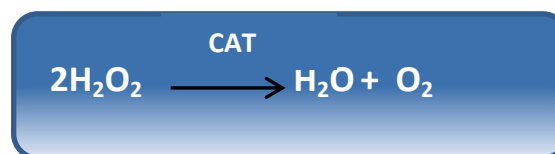
La superóxido dismutasa es una enzima ampliamente distribuida en los sistemas vivos, juega un papel fundamental en la regulación de tiempo de vida del ion superóxido y la protección de la citotoxicidad mediada por este radical.

Su principal función es actuar como mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo que se origina en ciertas condiciones fisiológicas y patológicas.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la reacción de dismutación de dos moléculas de superóxido para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular en condiciones de pH fisiológico, mediante la siguiente reacción:



Los peróxidos originados por acción enzimática de la SOD, son dismutados en un paso posterior por la enzima catalasa (CAT), generando como productos de la reacción, oxígeno y agua.



La enzima SOD dependiente de Cu y Zn se encuentra en eritrocitos bovinos y humanos. Es un dímero compuesto por dos subunidades idénticas³⁶. Cada subunidad contiene un ión Cu(II) (Figura 18) y un ión Zn(II) en el sitio activo. El rol del ión cobre es catalítico y es necesario para la función enzimática mientras que el ión Zn(II) no participa de la actividad enzimática, sino que desempeña un papel estructural, estabilizando la estructura de la proteína para generar las condiciones geométricas óptimas que facilitan la reacción catalítica³⁷. El ión Cu(II) interacciona con 4 nitrógenos imidazolínicos de restos de histidina en el sitio activo. Uno de esos grupos coordina simultáneamente al Cu(II) y al Zn(II) formando un puente entre ellos. La esfera de coordinación del Zn(II) se completa con 2 nitrógenos imidazolínicos y un oxígeno proveniente de un grupo carboxilato perteneciente a un ácido aspártico.

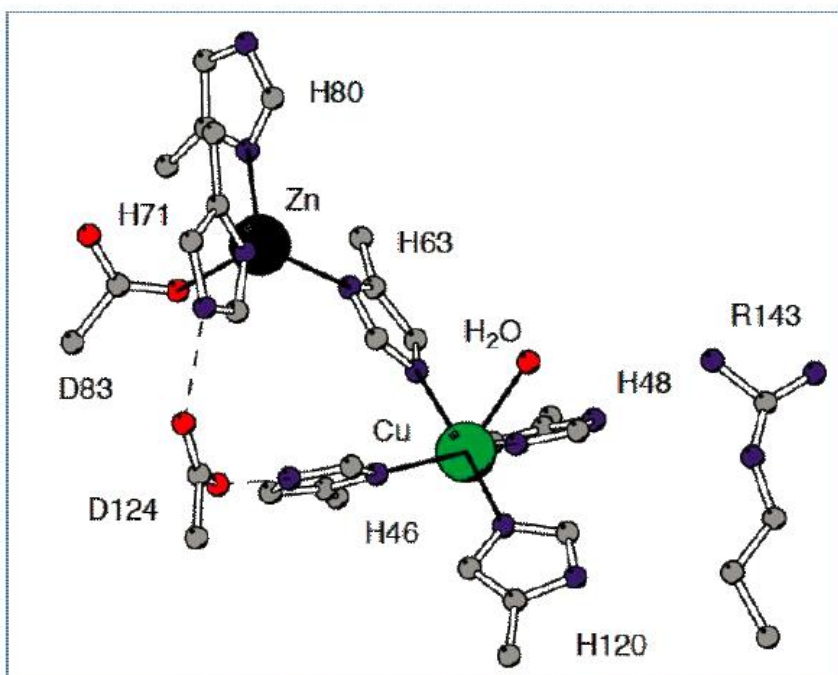


Figura 18. Sitio activo de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn.

Se sabe que la deficiencia de cobre en el organismo disminuye la actividad de la CuZn-SOD, lo que contribuye en el incremento de la producción de EROs³⁸.

Existe un número significativo de complejos metálicos de bajo peso molecular capaces de secuestrar el anión superóxido y otros radicales y especies reactivas que fueron propuestas para usarse como fármacos potenciales en varias enfermedades o como agentes “anti-edad”. Además, se conoce que la presencia de sitios de coordinación con anillos heteroaromáticos nitrogenados como imidazol, piridina y pirazol alrededor del Cu(II) aumentan la actividad

³⁶ S.M Lynch, S.A Boswell, W. Colón. *Biochemistry*. **2004**. 43(51), 16525-16531.

³⁷ H.J Forman, I. Fridovich. *J Biol Chem*. **1973**. 248, 2645-2649.

³⁸ J.Y Uriu-Adams, C.L Copper. *Aspects Med*. **2005**. 26, 268-298.

SOD³⁹. Este ión es fundamental en el control de procesos inflamatorios, en los que se incrementa la concentración del metal en suero y en consecuencia la ceruloplasmina hepática también aumenta su concentración⁴⁰ transportando el cobre a enzimas no hepáticas de cobre. Una enfermedad inflamatoria de articulaciones es la artritis reumatoidea y desde la antigüedad se utilizan brazaletes de cobre para su tratamiento⁴¹. También se eleva el nivel de cobre en suero en animales y humanos con cáncer y se sugirió que es una respuesta fisiológica diseñada para activar enzimas de cobre en células tumorales para inhibir su crecimiento⁴². De este modo resulta interesante la determinación de la actividad SOD de los complejos de Cu(II) con ligantes que imiten los sitios activos de los sistemas biológicos mencionados.

4.2.3. Estrés oxidativo y depresión

Como ya se mencionó, el estrés oxidativo es producido cuando hay un desbalance entre la defensa antioxidante y los metabolitos oxidantes, por lo que juega un rol importantísimo en la generación de diversas patologías incluidas los trastornos psiquiátricos como la depresión^{43,44,45}.

El cerebro es el órgano con consumo oxígeno comparativamente alto en el organismo, esto hace que presente una mayor vulnerabilidad al daño oxidativo dada las modestas defensas antioxidantes, la constitución rica en lípidos, la alta presencia de metales catalíticamente redox como el hierro y el cobre, y neurotransmisores con gran potencial reductor⁴⁶. La fragilidad que manifiesta el cerebro y la asociación entre los cambios neurodegenerativos y los trastornos psiquiátricos sugieren que los mecanismos de daño oxidativo pueden estar implicados en la patogénesis de la depresión, y que la suplementación con antioxidantes puede ser un objetivo en este tratamiento⁴⁷.

Las células en el cerebro son especialmente vulnerables a los efectos perjudiciales del estrés oxidativo debido a su alta tasa metabólica, la abundancia de sustratos altamente peroxidables (ácidos grasos poliinsaturados) y los modestos niveles de antioxidantes presentes⁴⁸. Diversos estudios clínicos en pacientes con depresión mostraron altos niveles séricos de metabolitos directamente relacionados con daño oxidativo en el ADN y en

³⁹ E. Bienvenue, S. Choua, M. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta, G. Tarrago. *J Inorg Biochem.* **1995.** 57, 157-168.

⁴⁰ H. Dollwet, J. Sorenson. *Trace Elem Med.* **1985.** 2, 80-87.

⁴¹ G. Jackson, P. May, D. Williams. *J Inorg Nucl Chem.* **1978.** 40, 1189-1194.

⁴² J. Sorenson, R. Milanino, K. Rainsford, G. Velo. *Eds Kluwer Academic Publishers Dordrecht.* **1989.** 69.

⁴³ P. Holvoet. *Acta Cardiol.* **2004.** 59(5), 479-484.

⁴⁴ M. Maes, P. Galecki, Y.S Chang, M. Berk. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2011.** 35(3), 676-692.

⁴⁵ H. Tsuboi, A. Tatsumi, K. Yamamoto, F. Kobayashi, K. Shimoi, N. Kinae. *J Affect Disord* **2006.** 91, 63-70.

⁴⁶ B. Halliwell. *J. Neurochem.* **2006.** 97, 1634-1658.

⁴⁷ M. Berk, F. Ng, O. Dean, S. Dodd, A.I Bush. *Trends Pharmacol Sci.* **2008.** 29, 346-351.

⁴⁸ J. Friedman. *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice.* Totowa, NJ: Humana Press. **2011.** 19-27.

lípidos⁴⁹, como lo son 8-Hydroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) y F2-isoprostanos que podrían actuar como biomarcadores de estrés oxidativo en la depresión mayor. Por otro lado los niveles de compuestos antioxidantes en plasma se encuentran disminuidos^{50,51,52} y aún más en el cerebro, en comparación con individuos sanos. Por ejemplo, los niveles de la coenzima Q10 (CoQ10), molécula clave con una fuerte actividad antioxidante, que se halla a nivel mitocondrial en la cadena transportadora de electrones, es significativamente mucho más baja en pacientes que presentan este trastorno psiquiátrico.

Varios ensayos clínicos demostraron que el tratamiento con antidepresivos tiene un efecto neuroprotector y que este depende del tiempo de duración de tratamiento con el fármaco, ya que pueden revertir el aumento del estrés oxidativo en pacientes con depresión. En los tratamientos a corto plazo con antidepresivos (4 a 8 semanas) no parecen modificar los parámetros oxidativo /antioxidante en pacientes, mientras que los tratamientos más largos (12 a 24 semanas) parecen inducir efectos antioxidantes⁵³.

4.2.4. Actividad antioxidante y enfermedad de Graves:

El incremento de las EROs está relacionado con el desarrollo de varias enfermedades, incluyendo las enfermedades autoinmunes como puede ser en este caso la enfermedad de Graves.

El hipertiroidismo no tratado farmacológicamente se caracteriza por un incremento en el estrés oxidativo, pero cierto nivel de carga oxidativa es necesaria para un funcionamiento normal de la glándula tiroides. En una tiroides saludable las EROs son producidas en el polo apical de los tirocitos donde el H₂O₂ es consumida durante la síntesis de las hormonas tiroideas o por los sistemas de defensas antioxidantes.

Se ha determinado en modelos animales y en pacientes que padecen la enfermedad de Graves, que el estrés oxidativo que se presenta en estos casos, le debe su origen a un estado hipermetabólico (originado por una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial) que viene acompañada por un incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs)⁵⁴. El estrés oxidativo en el hígado aumenta rápidamente después del aumento en las hormonas

⁴⁹ C.N Black, M. Bot, P.G Scheffer, P. Cuijpers, Brenda W.J.H Pennin. *Psychoneuroendocrinology*. **2015**. 51, 164-175.

⁵⁰ A. Sarandol, E. Sarandol, S.S Eker, S. Erdinc, E. Vatansever, S. Kirli. *Human Psychopharm.* **2007**. 22(2), 67-73.

⁵¹ B.E Cumurcu, H. Ozyurt, I. Etikan, S. Demir, R. Karlidag. *Psych Clin Neurosci*. **2009**. 63(5), 639-645.

⁵² P. Gałecki, J. Szemraj, M. Bienkiewicz, A. Florkowski, E. Gałecka. *Pharmacol Reports*. **2009**. 61(3), 436-447.

⁵³ A G Behr, J.C.F Moreira, B.N Frey. *Oxidat Med Cell Longevity*. **2012**. 13, 609421.

⁵⁴ V. Bacic-Vrca, F. Skreb, I. Cepelak, L. Mayer, Z. Kusic. B. Petres. *Clin Chem Lab Med*. **2005**. 43, 383-388.

tiroideas⁵⁵. En riñón y testículo de rata, el hipertiroidismo se asocia con un aumento del estrés oxidativo y peroxidación lipídica^{56,57,58}. El hipertiroidismo también se asocia con un aumento del estrés oxidativo y el daño oxidativo de los lípidos y el ADN genómico en la pared aórtica⁵⁹. En el músculo esquelético, el estrés oxidativo en el hipertiroidismo provoca un aumento en la modificación oxidativa en la cadena pesada de miosina generando como consecuencia la disminución en la realización de trabajo muscular⁶⁰.

Todos estos procesos oxidativos terminan desencadenando la génesis de la enfermedad de Graves⁶¹. Una de las consecuencias por el aumento de los EROs es el daño tisular que reportan varios investigadores en músculo esquelético, cardíaco, orbitopatías en ratas hipertiroideas^{62,63,64}.

Por otro lado se sabe que en los pacientes donde se implementa un tratamiento combinado de drogas antitiroideas como por ejemplo el metimidazol junto con agentes antioxidantes (a diferencia de los pacientes que solo reciben metimidazol) las hormonas tiroideas T3 y T4 se reducen a niveles normales⁶⁵ y además se comprobó que restaura el estado basal de la tiroides porque se asocia con una reversión de las anomalías bioquímicas asociadas con el estrés oxidativo (la actividad superóxido dismutasa disminuye de manera significativa), por lo tanto se pone de manifiesto las propiedades antioxidantes de estas drogas^{66,67}.

De acuerdo a estas observaciones, es interesante saber cuál sería la potencialidad que tendrían los complejos de cobre sintetizados como posibles agentes antihipertiroideos que puedan ser utilizados como terapia alternativa contra el estrés oxidativo provocado por la misma enfermedad.

4.2.5. Simulación de actividad de superóxido dismutasa (SOD)

⁵⁵ S. Chattopadhyay, D.K Sahoo, A. Roy, L. Samanta, G.B.N Chainy. *Cell Biochem and Funct.* **2010**. 28(2), 126-134.

⁵⁶ D.K Sahoo, A. Roy, S. Bhanja, G.B.N Chainy. *In J Exp Biol.* **2005**. 43(11), 1058-1067.

⁵⁷ A. Zamoner, K.P Barreto, D.W Filho. *Mol and Cell Endoc.* **2007**. 267(1-2), 116-126.

⁵⁸ R. Mogulkoc, A.K Baltaci, E. Oztekin, A. Ozturk, A. Sivrikaya. *Acta Biol Hung.* **2005**. 56(3-4), 225-232.

⁵⁹ K.G Moulakakis, M.V Poulakou, K.I Paraskevas. *In Vivo.* **2007**. 21(6), 1021-1026.

⁶⁰ T. Yamada, T. Mishima, M. Sakamoto, M. Sugiyama, S. Matsunaga, M. Wada. *J App Phys.* **2006**. 100(5), 1520-1526.

⁶¹ M. Zarkovic. *J Thyroid Res.* **2012**. 1-5.

⁶² T. Mano, R. Shinohara, Y. Sawai, N. Oda, T. Nishida, T. Mokuno, M. Kotake, M. Hamada, R. Masunaga, R. NaKai, A. Nagasaka. *J Endocrinol.* **1995**. 145, 131-136.

⁶³ D.R Doerge, A. Taurog, M. Dorris. *Arch Biochem Biophys.* **1994**. 315, 82-89.

⁶⁴ K. Asayama, K. Dobashi, H. Hayashibe, Y. Megata, K. Kato. *Endocrinology.* **1987**. 121, 2112-2118.

⁶⁵ L.N Guerra, S. Moiguer, M. Karmer, M.C de Molina, C.M Sreidr, J.A Burdman. *IUBMB Life.* **2001**. 51, 105-109.

⁶⁶ A.P Weetman. *Clin Endocrinol (Oxf).* **1986**. 25, 133-142.

⁶⁷ M. Whiteman, B. Halliwell. *Free Radic Biol Med.* **1997**. 22, 1309-1312.

La SOD es una enzima con muchísima relevancia médica por su potencialidad como agente terapéutico en las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y por su función moderadora de los daños generados por estos procesos⁶⁸.

Es por este motivo que la aplicación de la SOD como producto farmacéutico ha atraído la atención. Sin embargo, es muy difícil obtener de forma natural a la enzima porque posee muchas limitaciones como la falta de biodisponibilidad oral, su alto peso molecular la hace poco permeable a las membranas celulares (proporcionando una protección extracelular) y, además posee una baja estabilidad en la circulación sanguínea (aproximadamente 5 minutos). Por estos motivos para lograr ver sus efectos farmacológicos deben aplicarse varias dosis⁶⁹. Para superar todas estas dificultades se ha estimulado la búsqueda de compuestos sintéticos capaces de mimetizar la actividad de la enzima.

Se sabe que los complejos de cobre pueden participar en reacciones de óxido-reducción y aquellos que poseen una geometría distorsionada como en la enzima los convierte en moléculas biológicamente activas. Por estas características químicas se ha demostrado que pueden comportarse simulando la actividad de la SOD⁷⁰.

Por estas razones, uno de los objetivos tenidos en cuenta durante este trabajo es que los complejos sintetizados puedan ser buenos agentes biomiméticos de la actividad SOD y esto es de suma importancia ya que muchos de estos complejos surgen de una síntesis dirigida a imitar la esfera de coordinación de enzimas y proteínas y además pueden presentar una mayor biodisponibilidad, para que puedan ser propuestos como potenciales fármacos.

La actividad SOD de los potenciales agentes miméticos puede evaluarse mediante varios métodos, resultando muy difícil la comparación de los resultados con los valores obtenidos de la bibliografía. Los valores de IC_{50} reportados son dependientes tanto del detector utilizado (nitroazul de tetrazolio (NBT)) como de su concentración. Por este motivo, los valores IC_{50} no son los más apropiados para realizar comparaciones directas con datos de literatura ya que dicho valor disminuye a medida que la concentración de detector va siendo cada vez menor.

Por este motivo los valores de IC_{50} medidos, son convertidos en valores de la constante cinética para todos los complejos (k_{McCF} , constante cinética de McCord-Fridovich), que es independiente tanto de la concentración del detector como de su naturaleza⁷¹.

⁶⁸ M. Céspedes, M. Ela. *Rev Cubana Inv Biomed.* **1996.** 15, 75-80.

⁶⁹ Y. Yamamoto, Y. Tsutsumi, H. Yoshioka, K. Kamada, T. Sato Kamada, Y. Okamoto, H. Mukai, S. Shibata, T. Nakagawa, H. Mayumi. *J Control Release.* **2004.** 95, 229-237.

⁷⁰ H. Khalid, M. Hanif, M.A Hashmi, T. Mahmood, K. AyubMonim, M.-ul-Mehboob. *Mini Rev Med Chem.* **2013.** 13, 1944-1956.

⁷¹ S. Durot, C. Policar, F. Cisnetti, F. Lambert, J.P Renault, G. Pelosi, G. Blain, H. Korri-Youssoufi, J.P Mahy. *Eur J Inorg Chem.* **2005.** 14, 3513-3523.

El cálculo de la constante k_{McCF} se hace de la siguiente forma:

$$k_{McCF} = k_{\text{detector}} \times [\text{detector}] / IC_{50} (\text{compuesto})^{72}$$

Para el NBT, $k_{NBT} (pH = 7,8) = 5,94 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$ ⁽⁷³⁾.

4.2.5.1. Simulación de actividad superóxido dismutasa de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

Como se menciona en la sección Materiales y Métodos, se determinó la capacidad de dismutar los radicales superóxido mediante un método no enzimático en el cual se mide la capacidad SOD símil, generando el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) a través del sistema nitroazul de tetrazolio (NBT)/fenazina-metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH).

La cantidad de complejo que produce una inhibición del 50% de reducción de NBT se obtiene de la curva de porcentaje de inhibición *frente* al logaritmo negativo de la concentración del complejo.

Las determinaciones realizadas para sertralina indican que la misma no posee capacidad secuestrante.

Los resultados obtenidos para $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ se muestran en la Figura 19. El nuevo compuesto presenta actividad símil superóxido dismutasa con un valor de IC_{50} de $6,6 \times 10^{-6} \text{ M}$ y un valor de K_{McCF} de $2,83 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$ (K_{McCF} , constante cinética de McCord-Fridovich). Aunque estos valores no son tan efectivos como los de la SOD de eritrocito bovino (IC_{50} : $2,1 \times 10^{-7} \text{ M}$, K_{McCF} : $8,5 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{s}^{-1}$)⁷⁴, se sabe que los compuestos que presenten valores de IC_{50} que sean inferiores a $20 \times 10^{-6} \text{ M}$ se considera que poseen una fuerte actividad mimética SOD. Por lo tanto, se puede sugerir que el nuevo compuesto puede considerarse con capacidad superóxido dismutasa símil.

Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la actividad SOD depende fuertemente de la geometría alrededor del ión de cobre, siendo más efectivo en geometrías estructuralmente flexibles, lo que puede estar relacionado con la capacidad del ligando para adaptarse al cobre(I) en un entorno tetraédrico o lineal. Teniendo en cuenta la conocida variabilidad estructural de los tetrahalocupratos que pueden adoptar geometrías cuadrado plana, cuadrado plana distorsionada así como geometrías tetraédricas⁷⁵, se puede sugerir que el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ posee también esta capacidad de mostrar cambios geométricos⁷⁶. Ésta es una característica estructural esencial para que la

⁷² R.F Pasternack, B. Halliwell. *J Am Chem Soc.* **1979**. 101, 1026-1031.

⁷³ Z.R Liao, X.F Zheng, B.S Luo, L.R Shen, D.F Li, H.L Liu, W. Zhao. *Polyhedron.* **2001**. 20, 2813-2821.

⁷⁴ N.M Urquiza, M.S Islas, M.L Dittler, M.A Moyano, S.G Manca, L. Lezama, T. Rojo, J.J Martínez Medina, M. Diez, L. Lopez Tevez, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Inorg Chim Acta.* **2013**. 405, 243-251.

⁷⁵ H.M Mande, P.S Ghalsasi, A. Navamoney. *Polyhedron.* **2015**. 91, 141-149.

⁷⁶ D.W Smith. *Coord Chem Rev.* **1976**. 21, 93-158.

catálisis tenga lugar, ya que es la geometría del cobre en la enzima SOD que cambia durante la reacción de dismutación su entorno piramidal cuadrado distorsionado.

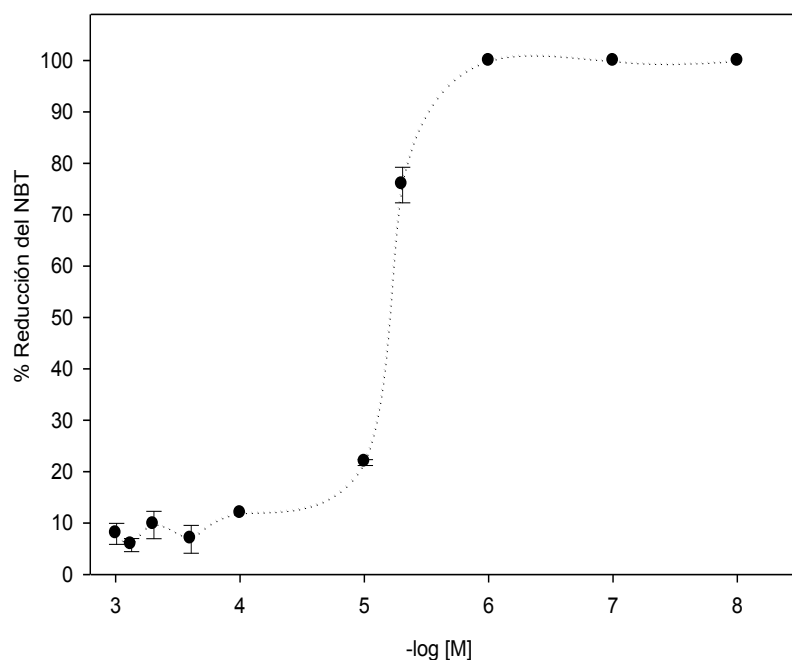


Figura 19. Porcentaje de la reducción de NBT vs $-\log$ de la concentración de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.

Para el caso de la sal de cobre $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, determinada previamente y cotejada con valores en la literatura, el valor de IC_{50} es llamativamente bajo, 3,6 μM . La explicación que dan Huber y colaboradores⁷⁷ es que el cobre además de disminuir la concentración del radical superóxido también es capaz a su vez de oxidar al NBT, por lo tanto se da lugar a una errónea interpretación de la actividad por la reacción del $\text{Cu}(\text{II})$ y el azul de formazán.

4.2.5.2. Actividad Superóxido dismutasa SOD-símil de los complejos $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}](1)$ y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}](2)$:

La determinación de la posible actividad SOD símil de los compuestos se midió sobre los complejos con cobre (1) y (2), y con la sal de cobre $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ con fines comparativos. Los valores de IC_{50} (concentración de complejo que secuestra un 50 % de los radicales $\text{O}_2^{\bullet-}$) son deducidos de la curva de porcentaje de reducción de NBT frente al logaritmo negativo de la concentración de los compuestos testeados Figura 20.

⁷⁷ E.L Amma, J. Roberts, K.R Huber, R. Sridhar, E.H Griffith. *Biochim Biophys Acta-Protein Struct Mol Enzymol.* **1987**. 915, 267-276.

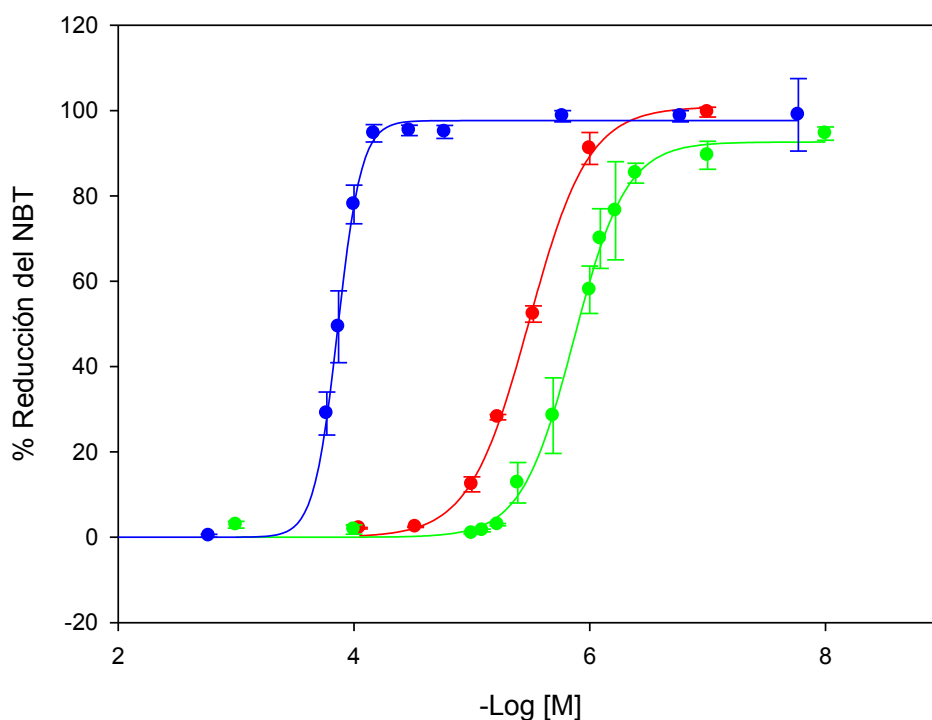


Figura 20. Porcentaje de reducción de NBT versus $-\log$ de la concentración de $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ (•), $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$ (•) y $\text{Cu}(\text{II})$ (•).

Los datos de actividad SOD de los compuestos son recopilados en la Tabla 2. Con fines comparativos, se presentan otros complejos de cobre con el ligando metimidazol.

Durante la realización de los ensayos, el metimidazol no exhibió la capacidad de dismutar a los radicales superóxido, pero cuando forma complejos de coordinación con el $\text{Cu}(\text{II})$, este nuevo compuesto mejora la capacidad de dismutación respecto al ligando libre.

Por otra parte, el comportamiento de los complejos fue notoriamente diferente.

El complejo $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}](2)$ mostró una muy buena actividad SOD-símil ($\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$) similar a la actividad del CuCl_2 ($\text{IC}_{50} = 3,6 \mu\text{M}$)⁷⁸ y algo menor que la SOD nativa ($0,21 \mu\text{M}$).

En cambio el complejo $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}](1)$ posee un valor de IC_{50} que supera 600 veces al de la enzima.

Cuando se comparan a los dos complejos entre sí, se observó que ambos poseen actividad catalítica pero con una marcada diferencia: el complejo(1) mostró un valor de $\text{IC}_{50} = 135 \mu\text{M}$ con un valor de constante $K_{\text{McCF}} = 1,32 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$ mientras que el complejo(2) arrojó un valor de $\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$ ($K_{\text{McCF}} = 1,49 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$), siendo su constante K_{McCF} un orden de magnitud más pequeño comparado con el de la SOD nativa; pero comparable con el complejo

⁷⁸ M.S Islas, T. Rojo, L. Lezama, M. Grier Merino, M.A Cortes, M. Rodriguez Puyol, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *J Inorg Biochem.* **2013.** 123, 23-33.

[CuC₃₈H₄₆N₁₂O₆]⁷⁹ ya que ambos cumplen con los requerimientos que son necesarios para ser considerados buenos compuestos SOD miméticos contando con una estructura geométrica distorsionada y compartiendo ligandos de coordinación similares.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ y constantes cinéticas.

Complejo	IC ₅₀ [M]	k _{McCF} [mol ⁻¹ Ls ⁻¹]
SOD Nativa ⁸⁰	0,21 x 10 ⁻⁶	8,5 x 10 ⁸
Cu(II) (CuCl ₂ ·2H ₂ O) ⁸¹	3,6 x 10 ⁻⁶	4,95 x 10 ⁶
[Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂ ·2H ₂ O] ⁸² (1)	135 x 10 ⁻⁶	1,32 x 10 ⁵
[Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ ·H ₂ O] ⁹ (2)	1,2 x 10 ⁻⁶	1,49 x 10 ⁷
[Cu(C ₈ H ₁₂ N ₄ S ₂)(H ₂ O) ₂](NO ₃) ₂ ·H ₂ O ⁸³	3,0 x 10 ⁻⁶	5,94 x 10 ⁶
[Cu ₂ C ₁₈ ClH ₁₇ N ₂ O ₇] ⁸⁴	0,1 x 10 ⁻⁶	2,68 x 10 ⁷

Las K_{McCF} fueron calculadas teniendo en cuenta el valor de constante: k_{NBT}(pH = 7,8) = 5,94 x 10⁴ mol⁻¹Ls⁻¹.

Varios son los factores que pueden explicar este comportamiento: (i) el más importante de todos sería la relación que existe entre la estructura del complejo con la actividad que manifiesta y, (ii) también se puede considerar el impedimento estérico de los ligandos.

Considerando estos factores, una estructura distorsionada en torno al centro de Cu(II) desempeña un papel relevante para la actividad SOD⁸⁵.

Si el entorno de coordinación se corresponde con una geometría cuadrado plana esto disminuye la posibilidad de interactuar al anión O₂⁻ impidiendo que se de lugar al proceso redox de Cu(II) a Cu(I). Se sabe que la geometría del

⁷⁹ A. Latif Abuhijleh, C. Woods. *Inorg Chem Comm.* **2002.** 5, 269-273.

⁸⁰ S.B Etcheverry, E.G Ferrer, L.G Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas, P.A.M Williams. *J Biol Inorg Chem.* **2008.** 13, 435-447.

⁸¹ M.S Islas, T. Rojo, L. Lezama, M. Griera Merino, M.A Cortes, M. Rodriguez Puyol, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *J Inorg Biochem.* **2013.** 123, 23-33.

⁸² N. Martini, J.E Parente, F.D'Alessandro, M. Rey, A. Rizzi, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Mol Biol Rep.* **2018.** 4, 867-885.

⁸³ N.M Urquiza, M.S Islas, M.L Dittler, M.A Moyano, S.G Manca, L. Lezama, T. Rojo, J.J Martínez Medina, M. Díez, L. López Tévez, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Inorg Chimica Acta* **405.** **2013.** 243-251.

⁸⁴ V.A Daier, E. Rivière, S. Mallet-Ladeira, D.M Moreno, C. Hureau, S.R Signorella. *J Inorg Biochem.* **2016.** 163, 162-175.

⁸⁵ H. Khalid, M. Hanif, M.A Hashmi, T. Mahmood, K. Ayub, M. Monim-ul-Mehboob. *Med Chem.* **2013.** 13, 1944-1956.

Cu(II) en la enzima SOD nativa es un tetraedro distorsionado con una molécula de agua lábil en el sitio de unión para el $O_2^{\cdot-}$, y se ha comprobado que complejos de cobre con un grado de distorsión estructural son aquellos que mejor capacidad demuestran para dismutar al anión superóxido^{86,87}. Así ha sido propuesta la siguiente correlación estructural: pirámide de base cuadrada > bipirámide trigonal > plano cuadrada. Esas consideraciones podrían ser la explicación de la eficacia de la complejo(2) con estructura de pirámide distorsionada respecto al complejo(1) con una estructura planar.

Esto se demuestra por ejemplo, en la serie de complejos estudiados por Daier y colaboradores³¹ para la cual el más activo (ver Tabla 1, estructura tetraédrica en solución) posee un valor de K_{McCF} del orden de 10^7 similar al encontrado para el complejo(2). Se comprueba además, que cuando los complejos de Cu(II) presentan el metal coordinado a tres o cuatro sitios donantes del ligando y la cuarta o quinta posición está ocupada por una molécula de agua o un grupo de coordinación lábil, son aquellos que exhiben la máxima actividad. A su vez, la presencia de ligandos rígidos o que confieran algún tipo de impedimento estérico para el acceso del superóxido, son aquellos de menor actividad SOD símil.

4.2.6. Actividad antioxidante DPPH[•]

4.2.6.1. Actividad antioxidante DPPH[•] para (SerH₂)₂[CuCl₄]

Tanto el complejo derivado de sertralina como el ligando sertralina no presentaron actividad antioxidante frente al radical DPPH[•].

4.2.6.2. Actividad antioxidante DPPH[•] para los complejos: [Cu(C₄H₅N₂S)₂Cl₂]·2H₂O(1) y Cu(C₈H₁₀N₄S)SO₄H₂O(2):

Como se viene realizando para todos los ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, se comparan los datos obtenidos para los complejos con los datos obtenidos o reportados para el ligando utilizado, la sal del metal correspondiente y algún/os compuestos similares. En ese sentido se determinó la actividad anti-DPPH[•] de los complejos (1 y 2) sintetizados y de un complejo que fue obtenido previamente en nuestro grupo de trabajo que contiene el ligando metimidazol y cuya actividad frente al DPPH[•] no había sido determinada, [Cu(C₄H₆N₂S)₂(H₂O)₂](NO₃)₂·H₂O.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para la capacidad secuestrante del radical DPPH[•] del complejo [Cu(C₄H₆N₂S)₂(H₂O)₂](NO₃)₂·H₂O y del complejo(1) (Figuras 21A y 21B, respectivamente). El complejo(2) no presentó actividad y en este caso la estructura distorsionada no favorece su actividad antirradicalaria. Los resultados se presentan como el porcentaje del basal en función de la concentración creciente del compuesto.

⁸⁶ K. Jitsukawa, M. Harata, H. Arai, H. Sakurai, H. Masuda. *Inorg Chim Acta*. **2001**. 324,108-116.

⁸⁷ R.N Patel, N. Singh, V.L.N Gundla. *Polyhedron*. **2006**. 25, 3312-3318.

En cambio en el complejo(1) manifestó una fuerte capacidad secuestrante (casi el 100% de los radicales) a una concentración de 85,25 μM Figura 21B.

El complejo $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ posee mejor actividad anti-DPPH $^{\bullet}$, ya que secuestró el 90% de los radicales con una concentración tres veces menor que el complejo(1) (Figura 21A), comportándose como un mejor agente antioxidante.

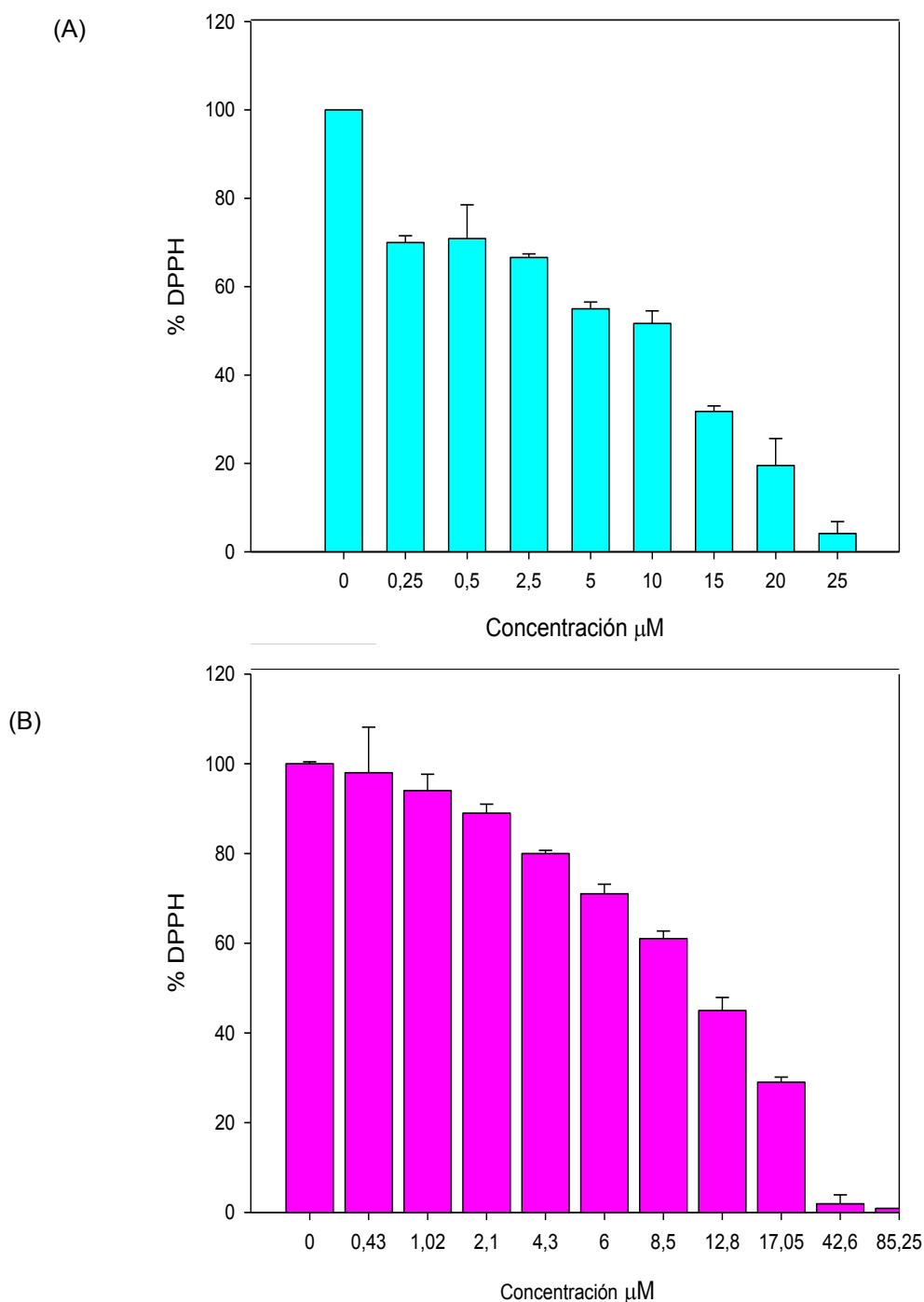


Figura 21. Efecto del complejo (A): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; (B): $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y sobre la reducción del radical DPPH $^{\bullet}$. Los valores son expresados como el promedio \pm error estándar en 3 ensayos independientes.

Las características químicas pueden tener influencia en el comportamiento observado. Medidas previas en nuestro grupo de trabajo mostraron que el $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ prácticamente no tiene efecto por sí solo llegando a disminuir sólo un 5% como máximo la presencia del radical (a $100 \mu\text{M}$)^{88,89} y que el metimidazol es efectivo en contra del DPPH[•] incluso con mayor rapidez que otros tioles similares. En su estructura, el metimidazol, posee tanto un grupo -NH como un grupo tiona/tiol $=\text{S}$ ó $-\text{SH}$ los que probablemente sean responsables de la actividad demostrada. Como se mencionara, la sal de cobre, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, de los cuales derivan los compuestos no tiene capacidad secuestrante significativa, pero estos autores demostraron que añadiendo el $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($10 \mu\text{M}$) a soluciones con metimidazol ($100 \mu\text{M}$) y DPPH[•] ($100 \mu\text{M}$) la velocidad de desaparición del radical se acelera 14 veces a su valor inicial. Se postuló entonces que la unión del Cu(II) a estos tipos de antioxidantes que contienen grupos tioles en su molécula da lugar a la formación de especies más reactivas.

Ahora bien, buscando una explicación para la actividad demostrada por el complejo(1), encontramos bibliografía en relación a algunos compuestos fenólicos e incluso algunas anilinas⁹⁰ que poseen una poderosa actividad antioxidante. Esa actividad ha sido relacionada a la presencia de grupos $-\text{OH}$ o $-\text{NH}_2$ en sus moléculas identificados como “grupos activos” capaces de formar puentes de hidrogeno intramoleculares. Se propone que los átomos de H no involucrados en este tipo de unión pueden ser sustraídos por los radicales libres. Pero ninguno de los complejos sintetizados, debido a la transformación sufrida por el ligando y a la coordinación vía el nitrógeno al Cu(II) posee estos grupos activos. Por esas razones buscamos en la literatura otras posibles causas y encontramos que otro factor a considerar son los impedimentos estéricos como resultado del tipo de ligandos. Por ejemplo, en los ácidos fenólicos y sus derivados hidroxílicos⁹¹ la cadena lateral de mayor voluminosidad (por ejemplo- $\text{CH}_2\text{-COOH}$) es la que tiene una gran influencia en la capacidad secuestrante respecto a la cadena lateral más corta (ej $-\text{COOH}$).

También se ha relacionado este efecto a compuestos derivados de catecoles, en los que la inserción de grupos metileno y etileno entre el anillo de catecol y el grupo carboxilato favorecieron a la desaparición del radical⁹². Entonces, en base a lo reportado en literatura, podemos sugerir que la presencia de un puente disulfuro en el complejo (1) posiblemente sea la responsable de generar una estructura más voluminosa que podría ser la razón de la actividad DPPH[•]. Sin embargo para poder confirmar nuestra hipótesis deben hacerse una mayor cantidad de estudios.

⁸⁸ M.S Islas, T. Rojo, L. Lezama, M. Grier Merino, M.A Cortes, M. Rodriguez Puyol, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *J Inorg Biochem.* **2013.** 123, 23-33.

⁸⁹ R.C Smith, J.Z Gore. *Acta Biol Bulg.* **1991.** 62, 1-4, 105-110.

⁹⁰ E. Bendary, R.R Francis, H.M.G Ali, M.I Sarwat, S.El Hady. *AOAS.* **2013.** 58,173-181.

⁹¹ P. Jing, S.J Zhao, W.J Jian, B.J Qian, Y. Dong, J. Pang. *Molecules.* **2012.** 17, 12910-12924.

⁹² S.A Ordoudi, M.Z Tsimidou, A.P Vafiadis, E.G Bakalbassis. *J Agric Food Chem.* **2006.** 54, 5763-5768.

4.3. Fosfatasas

4.3.1 Introducción:

En los últimos años y, debido a las potenciales aplicaciones de los compuestos de coordinación en medicina, se ha incrementado ampliamente el estudio de la inhibición enzimática por parte de los mismos.

En este aspecto se tiene conocimiento de que los metales pesados como Hg(II), Cd(II) son capaces de inhibir a ambas formas de la enzima (ácida y alcalina)⁹³, y en este sentido el ión Cu(II) tanto en su forma libre⁹⁴ y otras veces en su gran mayoría sus complejos de coordinación están implicados en procesos de inhibición enzimática en diferentes aplicaciones, como por ejemplo:

- (i) contra el cáncer, se ha reportado inhibición de la ribonucleótido reductasa, la proteína C quinasa y la topoisomerasa III,
- (ii) contra la hipertensión, inhibición de la anhidrasa carbónica y de la enzima convertidora de angiotensina,
- (iii) en aplicaciones neurológicas, inhibición de la monoamina oxidasa,
- (iv) para la artritis, inhibición de elastasa, colagenasa, lipoxigenasa, catepsina, y la ciclooxygenasa

En nuestro grupo⁵⁷ ya se ha demostrado anteriormente, que el metimidazol y su complejo de cobre (II) se comportan como inhibidores de la fosfatasa alcalina (FAL) y ácida (FAC); es por este motivo existe un gran interés en poder determinar si los nuevos compuestos sintetizados derivados de Cu(II) y metimidazol, son posibles agentes inhibidores de las fosfatasas.

4.3.1.1. Aspectos generales

La fosfatasa alcalina es una enzima (EC 3.1.3.1) fosfomonoesterasa no específica que se encuentra tanto en procariotas como eucariotas, cuya función consiste en catalizar la eliminación de grupos fosfatos de varios tipos de moléculas como nucleótidos, proteínas, alcaloides y otros sustratos, mediante el proceso de desfosforilación, dando lugar a la liberación de una molécula de ion fosfato y una de alcohol, cuya naturaleza depende del sustrato utilizado y, la aparición de un grupo hidroxilo en la posición en la que se encuentra esterificado el grupo fosfato.

La enzima orto-fosfórico-monoéster hidrolasa es conocida normalmente como enzima fosfatasa, existiendo dos formas, ácida y alcalina. Ambas catalizan la misma reacción, pero a valores de pH diferentes. La fosfatasa alcalina se encuentra presente en casi todos los tejidos del organismo, siendo su valor particularmente alto en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón. En particular, la fosfatasa alcalina es una enzima relevante debido a sus funciones

⁹³ M.T Mazorr, J.A Rubio, J. Blasco. *Comp Biochem and Phys Part B: Biochem Mol Biol.* **2002.** 131(2), 241-249.

⁹⁴ Q. Huang, H. Shindo. *Soil Biol Biochem.* **2000.** 32(13), 1885-1892.

fisiológicas y en el diagnóstico médico. La fosfatasa ácida se encuentra en vegetales, levaduras y en casi todos los tejidos del organismo tales como próstata, estómago, hígado, músculo, pero prácticamente se encuentra ausente en huesos y mucosa intestinal.

Las fosfatasas juegan un rol importante en la transducción de señales y en la regulación de procesos celulares. Junto con las quinasas mantienen el control del nivel de fosforilación de las células. Un mal funcionamiento de la actividad de las fosfatasas está asociado a diferentes patologías tales como diabetes, desorden autoinmune, enfermedades neurológicas, cáncer, entre otras.

4.3.1.2. Estructura general de la fosfatasa

La estructura primaria de las fosfatasas demuestra una alta conservación entre especies. La estructura secundaria del sitio activo de la mayoría de las fosfatasas, consiste de dos cadenas de polipéptidos idénticos (homodímero).

Cada una de las subunidades posee un sitio activo (Figura 22) que involucra la coordinación de dos iones de Zn(II) (Zn1-Zn2), que están puenteados por el sustrato fosfato y cercanos al residuo nucleofílico Ser 102⁹⁵ y un ión Mg(II) (a 4,9 y 7,1 Å de cada átomo de Zn)⁹⁶.

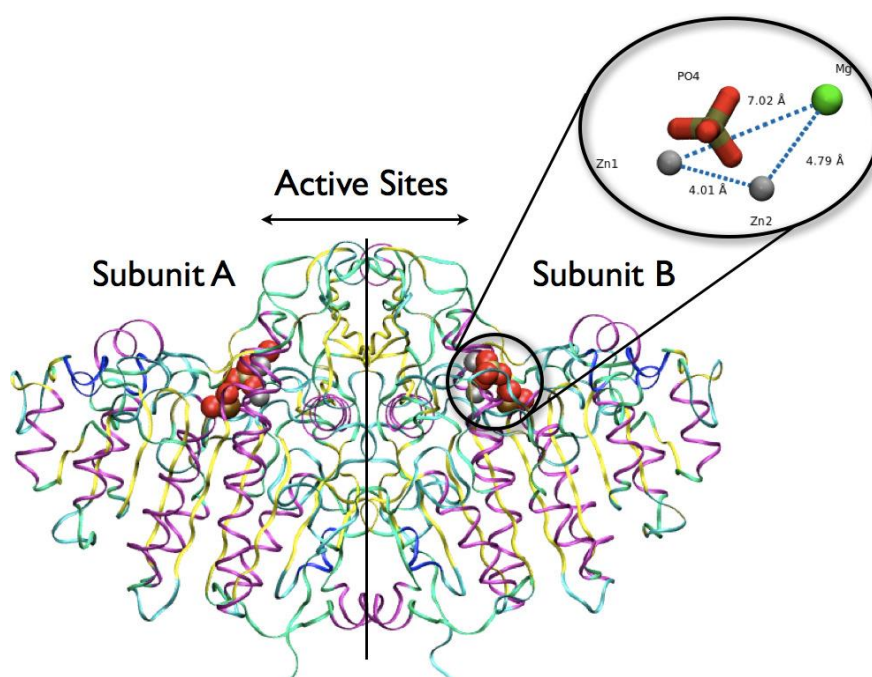


Figura 22. Estructura secundaria de la FAL. Tomada y modificada de Chikvaidze (2013)⁹⁷.

⁹⁵ F. Coleman. 2011. Tesis doctoral.

⁹⁶ J.E Coleman. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1992. 21, 441-483.

⁹⁷ M. Chikvaidze. 2013. Tesis doctoral.

Se sabe que los iones de Zn(II) generan un ambiente electropositivo⁹⁸ favoreciendo las condiciones ambientales que son necesarias para la hidrólisis de los grupos fosfato y la perfecta conformación de la fosfatasa para realizar la catálisis. Mientras que el ión Mg(II) estabiliza la estructura de la enzima y regula el modo de unión del zinc aumentando la actividad enzimática.

Como mencionamos previamente la fosfatasa ácida (FAC) forma parte de un grupo de enzimas (EC 3.1.3.2) ampliamente distribuida en la naturaleza, cataliza la hidrólisis de ésteres de fosfato en un rango de valores de pH que va de 4-6. La función biológica de esta enzima es diversa, entre ellas se incluye la resorción ósea^{99,100}, la muerte microbiana, el transporte de hierro¹⁰¹ en animales, la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como respuesta inmune¹⁰² y la incorporación de fosfatos por las plantas.

Esta es una metaloenzima que se encuentra como un homodímero de 110 KDa, donde cada subunidad consta de un dominio N-terminal (cuya función es desconocida) y un dominio catalítico C-terminal que se parece mucho a la estructura global de la enzima de mamífero.

La estructura y el mecanismo de acción es muy similar al de la FAL. El sitio activo de la FAC posee de dos iones metálicos distintos entre sí. Uno de ellos es el Fe(III) que está siempre presente mientras que el segundo sitio puede variar. Por ejemplo, éste puede ser otro ión Fe(II) formando así una cupla redox en el sitio activo (Fe (II/III) en los mamíferos^{103,104} (Figura 23) o un ión Zn(II) o Mn(II) en las plantas^{60,105} (Figura 24).

En el caso de los mamíferos se trata de una proteína monomérica de 35 kDa también conocida como fosfatasa ácida tartrato resistente (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP o TRACP).

⁹⁸ C. Xie, R. Lu, Y. Huang, Q. Wang, X. Xu. *Biores Tech.* **2010**. 101, 3394-3399.

⁹⁹ G.W Oddie, G. Schenk, N.Z Angel, N. Walsh, L.W Guddat, J. de Jersey, A.I Cassady, S.E Hamilton, D.A Hume. *Bone*. **2000**. 27, 575-584.

¹⁰⁰ B. Ek-Rylander, M. Flores, M. Wendel, D. Heinegard, G. Andersson. *J Biol Chem*. **1994**. 269, 14853-14856.

¹⁰¹ R. Nuttleman, R.M Roberts. *J Biol Chem*. **1990**. 265, 12192-12199.

¹⁰² H. Kaija, S.L Alatalo, J.M Halleen, Y. Lindqvist, G. Schneider, H.K Vaananen, P. Vihko. *Biochem Biophys*. **2002**. 292, 128-132.

¹⁰³ D. Wang, L.R.C Holz, S.S David, L. Que, Jr.M.T Stankovich. *Biochemistry*. **1991**. 30, 8187-8194.

¹⁰⁴ P.V Bernhardt, G. Schenk, G.J Wilson. *Biochemistry*. **2004**. 43,10387-10392.

¹⁰⁵ J.L Beck, L.A McConachie, A.C Summors, W.N Arnold, J. de Jersey, B. Zerner. *Biochem Biophys Acta*. **1986**. 869, 61-68.

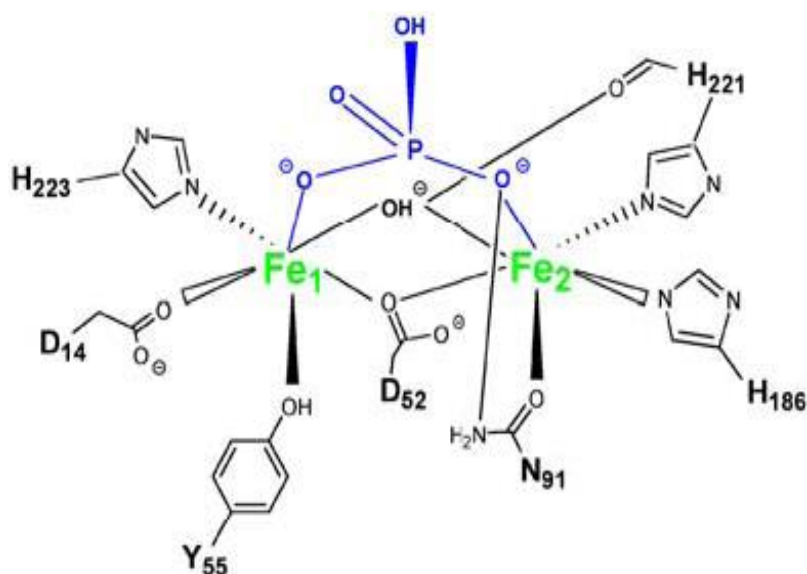


Figura 23. Estructura del sitio activo de la FAc en mamíferos.

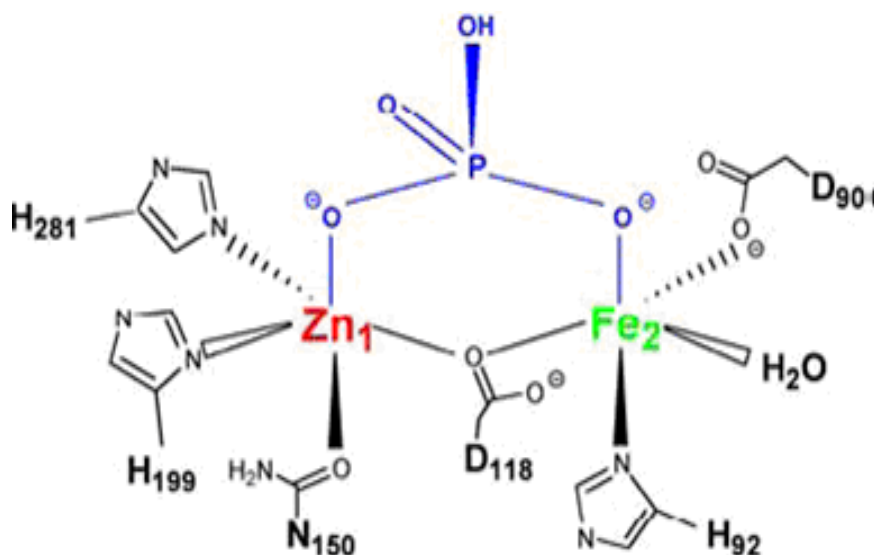


Figura 24. Estructura del sitio activo de Calciounerina.

Se conocen las estructuras cristalinas de FAc humana¹⁰⁶, cerdo¹⁰⁷, de rata^{108,109} y FAc de plantas^{110,111}. A su vez que se ha determinado que los ligandos aminoácidos de los iones metálicos en el sitio activo son similares en

¹⁰⁶ N. Sträter, B. Jasper, M. Scholte, B. Krebs, A.P Duff, D.B Langley, R. Han, B.A Averill, C.H Freeman, J.M Guss. *J Mol Biol.* **2005.** 351, 233-246.

¹⁰⁷ L.W Guddat, A.S McAlpine, D. Hume, S. Hamilton, J. de Jersey, J.L Martin. *Structure.* **1999.** 7, 757-767.

¹⁰⁸ J. Uppenberg, F. Lindqvist, C. Svensson, B. Ek-Rylander, G. Andersson. *J Mol Biol.* **1999.** 290, 201-211.

¹⁰⁹ Y. Lindqvist, E. Johansson, H. Kaija, P. Vihko, G. Schneider. *J Mol Biol.* **1999.** 291, 135-147.

¹¹⁰ G. Schenk, L.R Gahan, L.E Carrington, N. Mitic, M. Valizadeh, S.E Hamilton, J. de Jersey, L.W Guddat. *Proc Natl Acad Sci U SA.* **2005.** 102, 273-278.

¹¹¹ N. Sträter, T. Klabunde, P. Tucker, H. Witzel, B. Krebs. *Science.* **1995.** 268, 1489-1492.

las FAc de plantas y animales, habiendo algunas diferencias en las identidades de los residuos. La diferencia entre ambas enzimas podría deberse a la presencia de un residuo aminoácido de serina¹¹² (Ser) mientras que en la FAc se encuentra presente un amino de histidina (His).

4.3.1.3. Mecanismo de acción de la enzima

El mecanismo propuesto para la fosfatasa alcalina (Figura 25) se basa en dos ataques nucleófilos consecutivos^{113,97}

La reacción se produce a través de una serie de cuatro pasos:

1. La enzima se une al sustrato para formar un complejo no covalente E•ROP
2. El grupo hidroxilo desprotonado de Ser102 ataca al átomo de fósforo del grupo fosfato del sustrato, para formar un complejo intermediario covalente serina-fosfato E-P
3. Un ion hidroxilo coordinado a Zn1 ataca al fosfato para formar un complejo no covalente enzima-fosfato E•P_i
4. Por último P_i es liberado, restituyéndose la enzima libre

Este mecanismo esta esquematizado en la siguiente Figura 25

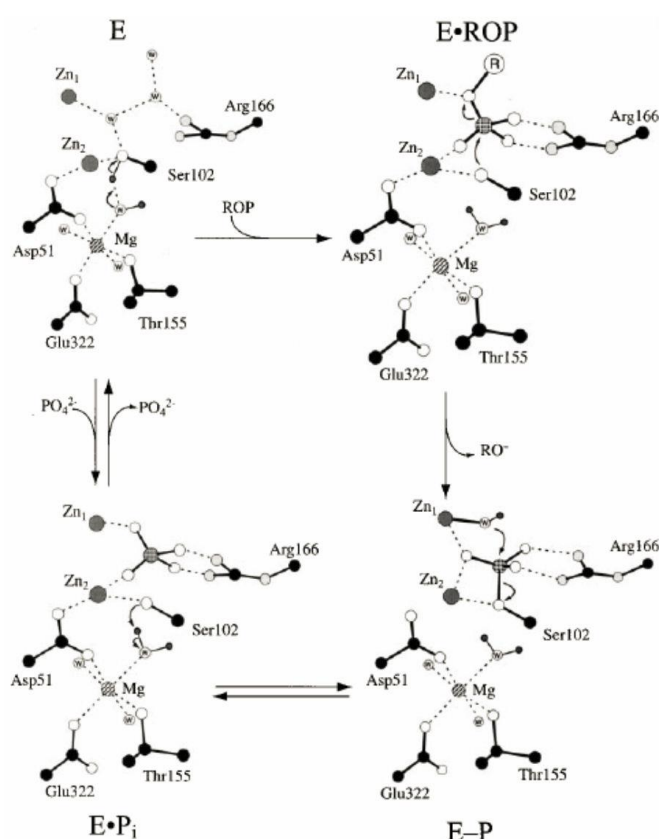


Figura 25. Mecanismo catalítico propuesto para la actividad de la fosfatasa alcalina. Se representan los átomos de hidrógeno sólo en sitios catalíticos relevantes¹¹⁴.

¹¹² E. Guija, M. Soberón, H. Haak-Mares. *An Fac Med Lima*. **2007**. 68, 356-362.

¹¹³ E.E Kim, H.W Wyckoff. *J Mol Biol*. **1991**. 218, 449-464.

¹¹⁴ B. Stec, K.M Holtz, E.R Kantrowitz. *J Mol Biol*. **2000**. 299, 1303-1311.

Como puede observarse en la Figura 25, en la enzima libre (E, parte superior izquierda), tres moléculas de agua en el sitio activo y el grupo hidroxilo de Ser 102 participan en un enlace hidrógeno con el ion hidróxido de una molécula de agua coordinado al ion Mg(II). Tras la unión del fosfomonoéster (ROP) a la enzima para formar el complejo enzima- sustrato de Michaelis (E•ROP, Figura 25, parte superior derecha), el O^γ de Ser102 queda desprotonado para el ataque nucleofílico con la consiguiente transferencia del protón al grupo hidróxido coordinado a Mg(II) para formar una molécula de agua.

La coordinación del O^γ de Ser102 al ion Zn₂ estabiliza la forma desprotonada de Ser102 necesaria para el ataque nucleofílico al grupo fosfato¹¹⁵.

En este mecanismo de desplazamiento lo primero que se produce es el ataque del grupo hidroxilo activado de Ser102 al fósforo central del sustrato en el complejo enzima-sustrato (E•ROP) para formar un intermediario covalente serina-fosfato (E-P, Figura 25, abajo derecha). En este paso el ion Zn1 participa coordinándose al átomo de oxígeno puente del sustrato y además, estabiliza la carga desarrollada sobre el oxígeno del grupo alcohol formado (RO⁻) facilitando su salida. El lugar del alcóxido (RO⁻) es ocupado por una molécula de agua que se disocia para convertirse en Zn1-OH¹¹⁶.

En la segunda etapa del desplazamiento, el ion hidróxido nucleofílico coordinado a Zn1 ataca el átomo de fósforo, hidrolizando al intermediario covalente serina-fosfato para formar el complejo no covalente enzima-fosfato (E•P_i, Figura 25, abajo a la izquierda) y regenerar el nucleofílico Ser102.

El ion Zn1 reduce el pK_a de la molécula de agua coordinada a él para formar el ion hidróxido nucleofílico, mientras que el ion Mg(II) coordinado a una molécula de agua actúa como un ácido general para protonar nuevamente el O^γ de Ser102, lo cual facilita la salida del fosfato desde el complejo no covalente E•P_i. Alternativamente, la molécula de agua coordinada al ion Mg(II) puede directamente protonar el grupo fosfato para su liberación del complejo E•P_i y simultáneamente regenerar la enzima libre (E, Figura 25, arriba a la izquierda) lo que además se ve favorecido por el aumento de movilidad de la Arg166 de la cadena lateral¹¹⁶.

Debemos tener en cuenta que la Arg166 en el sitio activo, interactúa a través de los nitrógenos del grupo guanidinio formando enlace hidrógeno con los dos átomos de oxígeno no enlazados del grupo fosfato. El pH es el factor determinante de la velocidad de esta reacción, a pH ácido la hidrólisis del complejo covalente E-P_i es la limitante de la velocidad, mientras que en condiciones básicas la etapa limitante de la reacción es la disociación de P_i del complejo no covalente E•P_i¹¹⁷.

¹¹⁵ J.G Zatalan, D Herschlang. *J Am Chem Soc.* **2006.** 128, 1293-1303.

¹¹⁶ G. Hou, Q. Cui. *J Am Chem Soc.* **2012.** 134(1), 229-246.

¹¹⁷ J. Wang, E.R Kantrowitz. *Prot Scien.* **2006.** 15, 2395-2401.

En el caso de la fosfatasa ácida, experimentos realizados en relación al efecto del pH sobre la catálisis de la reacción sugirieron que en el sitio activo de la enzima existiría un residuo de aminoácido con un pK_a de 6,2 el que correspondería a la histidina, la que se encontraría en su forma protonada. Esto le permitiría ceder su protón al sustrato, quedando de esta manera desprotonada, lo que facilitaría el ataque nucleofílico al mismo, así como, la liberación del fenol o p-nitrofenol y la formación del intermediario covalente enzima-fosfato. En definitiva el mecanismo es similar al de la fosfatasa alcalina donde la diferencia estaría en la presencia de un residuo de aminoácido serina en este caso con el grupo $-OH$ desprotonado¹¹⁸.

Por otra parte es de gran interés poder hallar nuevos compuestos que sean capaces de poder inhibir la actividad de FAc ya que podrían poseer aplicación clínica en el tratamiento de diversas enfermedades que tienen niveles elevados de esta enzima en el suero como pueden ser osteoporosis, encefalopatía, SIDA, enfermedad de Guacher, leucemia, enfermedad de Alzheimer, metástasis ósea, hiperparatiroidismo, cáncer de próstata, quimioterapéuticos etc^{119,120,121} (para este último caso es interesante porque retrasa la generación de tumores).

Se conoce que la actividad de la FAc puede ser inhibida por ciertos metales como $Hg(II)$, $Cr(VI)$, $Bi(III)$ ¹²², $Cd(II)$ ¹²³, algunos oxoaniones¹²⁴ como $HAsO_4^{-2}$, WO_4^{-2} y MoO_4^{-2} , y también compuestos orgánicos¹²⁵.

4.3.2. Efectos de los complejos sobre la actividad de la Fosfatasa ácida (FAc)

En los últimos años se han incrementado los estudios de la inhibición enzimática por parte de complejos de coordinación metálicos ya que prometen posibles aplicaciones en medicina. Pero aún no existe actualmente suficiente evidencia en la literatura respecto a pruebas inhibitorias sobre esta metaloenzima por parte de compuestos de coordinación. Hasta el momento los complejos de coordinación de vanadio son los compuestos inhibidores de FAc más reconocidos^{126,127}.

¹¹⁸ E. Guija, M. Soberón, H. Haak-Mares. *An Fac Med Lima*. **2007**. 68, 356-362.

¹¹⁹ D. Feder, W.M Hussein, D.J Clayton, M.W Kan, G. Schenk, R.P McGeary, L.W Guddat. *Chem Biol Drug Des*. **2012**. 80, 665-674.

¹²⁰ C. Ozu, J. Nakashima, Y. Horiguchi, M. Oya, T. Ohigashi, M. Murai. *Int J Urol*. **2008**. 15, 419-422.

¹²¹ A. Taira, G. Merrick, K. Wallner, M. Dattoli. *Oncology (Williston Park)*. **2007**. 21, 1003-1010.

¹²² U. Blum, G. Schwedt. *Anal Chim Acta*. **1998**. 360, 101-108.

¹²³ M. Vlahović, L. Ilijin, A. Matic, J. Lazarević, V. Nenadović, V. Perić Mataruga, M. Mrdaković. *Arch Biol Sci*. **2013**. 65, 345-352.

¹²⁴ N.G Juma, M.A Tabatabai. *Soil Sci Soc Am J*. **1977**. 41, 343-346.

¹²⁵ S.H Mohd-Pahmi, W.M Hussein, G. Schenk. *Bioorg Med Chem Lett*. **2011**. 21, 3092-3094.

¹²⁶ C.C McLauchlan, J.D Hooker, M.A Jones, Z. Dymon, E.A Backhus, B.A Greiner, N.A Dorner, M.A Youkhana, L.M Manus. *J Inorg Biochem*. **2010**. 104, 274-281.

¹²⁷ L. Lu, M. Zhu. *Agents Med Chem*. **2011**. 11, 164-171.

Por otra parte existen muy pocos ejemplos de compuestos de coordinación que inhiban la FAc; sólo se han demostrado algunos complejos de Cu(II) que actúan sobre la proteína tirosina fosfatasa¹²⁸ (PTP), la fosfatasa alcalina FAL¹²⁹, y algunos complejos de Zn(II)¹³⁰. Por todo lo mencionado previamente ha sido de mucho interés medir el efecto de los compuestos sintetizados sobre la actividad enzimática.

Como hemos mencionado anteriormente, los altos niveles de expresión de FAc en ratones transgénicos *Knock-out* con sobreexpresión de la actividad de FAc en los osteoclastos, se registra una disminución en la densidad ósea trabecular consistente con la aparición de la osteoporosis y esto mismo también se ha observado tanto pacientes con enfermedades metabólicas óseas incluyendo la osteoporosis y cánceres con metástasis en hueso. Esos hechos proporcionan evidencia sustancial para implicar a la FAc como un objetivo para el desarrollo de tratamientos quimioterapéuticos con el objetivo de que inhiban a la enzima y así poder contar con potenciales agentes terapéuticos para luchar contra esta enfermedad, y que al mismo tiempo puedan eventualmente contrarrestar los efectos indeseados causados por la medicación. En ese sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado compuestos con potencial actividad inhibidora de la fosfatasa ácida conteniendo el ligando metimidazol¹³¹. Se ha encontrado que el complejo ternario $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{fen})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ (Metimidazol = $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}$, fen = fenantrolina) es capaz de inhibir a la FAc con un IC_{50} de 300 μM , mientras que el compuesto binario $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ disminuye la actividad en un 20 % con un valor de concentración 500 μM (Tabla 3). Además se sabe que el metimidazol no es capaz de inhibir a la FAc (derivada de papa, P-3752)⁶; y que el Cu(II) logra reducir la actividad de la fosfatasa ácida derivada de germen de trigo¹³².

Como se mencionara en la sección 3.1 durante la síntesis del complejo(2), el metimidazol se transforma en un ligando bidentado oxidado que puede coordinar al Cu(II) a través de los átomos de nitrógeno conteniendo el ligando transformado, un puente –S– entre las dos entidades de metimidazol. Este complejo fue ensayado en iguales condiciones experimentales que los complejos derivados de metimidazol mencionados anteriormente exhibiendo un comportamiento inhibitorio que se encuentra en el mismo orden de magnitud que el complejo ternario con un valor de $\text{IC}_{50} = 416 \mu\text{M}$ (Figura 26A).

¹²⁸ Y. Li, L. Lu, M. Zhu, Q. Wang, C. Yuan, S. Xing, X. Fu, Y. Mei. *BioMetals*. **2011**. 24, 993-1004.

¹²⁹ (a) N.M Urquiza, S.G Manca, M.A Moyano, R. Arrieta Dellmans, L. Lezama, T. Rojo, L.G Naso, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *BioMetals*. **2010**. 23, 255-264; (b) N.M Urquiza, M.S Islas, M.L Dittler, M.A Moyano, S.G Manca, L. Lezama, T. Rojo, J.J Martínez Medina, M. Diez, L. López Tévez, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Inorg Chim Acta*. **2013**. 405, 243-251.

¹³⁰ (a) N. Martini, K. Jori, N. Jori, N.R Maresca, C.H. Laino, L.G Naso, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**. 31, 1625-1631 (b) V.R Martínez, M.V Aguirre, J.S Todaro, O.E Piro, G.A Echeverría, L.G Naso, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *Biol Trace Elements Res.* **2018**. 186, 413-429.

¹³¹ N.M Urquiza, M.S Islas, S.T Ariza, N. Jori, J.J Martínez Medina, M.J Lavecchia, L.L López Tévez, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Chem-Biol Interact.* **2015**. 229, 64-72.

¹³² Q. Huang, H. Shindo. *Soil Biol Biochem.* **2000**. 32, 1885-1892.

Datos encontrados en la literatura muestran complejos con valores de IC_{50} similares (actividad moderada) para derivados de dietilalquilsulfonamida(4-metoxifenil) metilfosfonato y ácido fosfónico los cuales actúan como inhibidores de la FAc de semilla de poroto colorado¹³³.

Ambos complejos presentan una simetría axial más rígida conteniendo un ligando bidentado en la esfera de coordinación del metal. Sin embargo, el complejo(1) demostró una alta eficiencia de inhibición enzimática con valores de IC_{50} valor de 0,58 μM (Figura 26B), cuando se lo compara con todos los complejos derivados de Cu(II) y metimidazol sintetizados por nuestro grupo de trabajo.

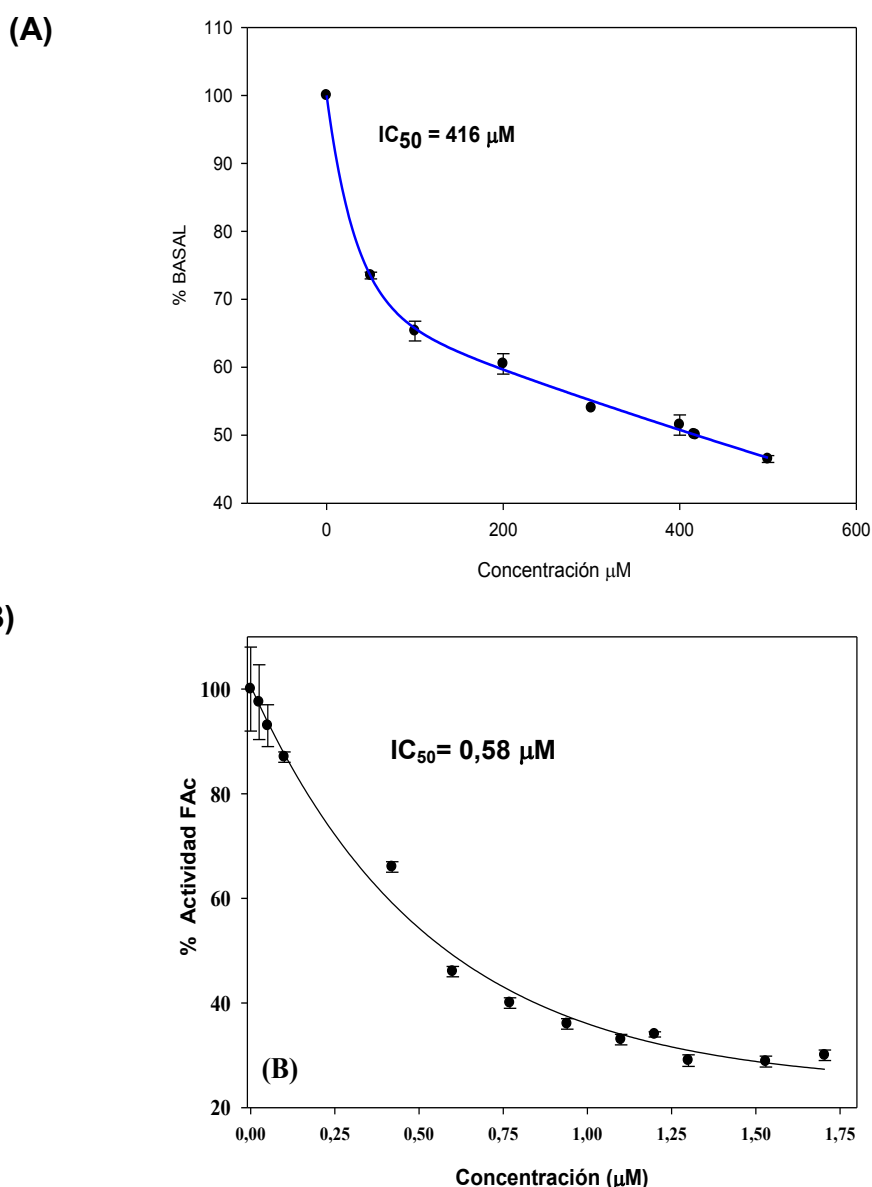


Figura 26. Efecto de los complejos sobre la actividad de la fosfatasa ácida. (A) $[Cu(C_8H_{10}N_4S)SO_4H_2O]$ (2) y (B) $[Cu(C_4H_5N_2S)_2Cl_2] \cdot 2H_2O$ (1). Los valores son expresados como la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes.

¹³³ N. Alimoradi, M.R Ashrafi-Kooshk, M. Shahlaei, S. Maghsoudi, H. Adibi, R.P McGeary, R Khodarahmi. *J Enz Inhib Med Chem.* **2017.** 32, 20-28.

Esta diferencia de inhibición tan marcada puede explicarse por la estructura geométrica y la presencia de cloruros, que son ligandos lábiles del complejo que permiten eventualmente que el compuesto pueda acceder al sitio activo para interactuar con la enzima. Y, de esta forma, posiblemente ejerza su acción a través del mecanismo de sustitución de ligando por biomoléculas en donde el ión metálico pueda unirse a residuos de proteínas (átomos de nitrógeno, azufre o selenio de la histidina, cisteína o seleno cisteína)¹³⁴.

Hasta el momento el valor de IC₅₀ que presenta el complejo(1) lo convierte en un muy buen inhibidor de la FAc.

Otros inhibidores que presentan actividad sobre fosfatasa ácida lo hacen pero en un rango de concentración mucho más grande que el del complejo(1): péptidos fosfotirosilos (1-100 µM)¹³⁵, molibdato, fluoruro, vanadato (10 mM)¹³⁶, ácido fosfónico (80-7600 µM)¹³⁷, inhibidores basados en fragmentos (1 mM)¹³⁸ y complejos de vanadio (2,3-230 µM)¹³⁹ y de cinc ([Zn(Los)₂].3H₂O (Los: losartan, 50 µM, [Zn(S-Met)₂], S-Met=S-metilcisteína, 250 µM.)¹³¹. De esta forma queda demostrado que el complejo(1) puede ser un excelente candidato como inhibidor de la FAc.

Tabla 3. Resumen sobre la actividad FAc de los complejos.

Compuestos	Fosfatasa ácida
Cu(II) ^a	Inhibe
Metimidazol	No inhibe
[Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂].2H ₂ O (1):	IC ₅₀ = 0,58 µM
[Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ H ₂ O] (2)	IC ₅₀ = 416 µM
[Cu(C ₄ H ₆ N ₂ S) ₂ (H ₂ O) ₂](NO ₃) ₂ H ₂ O	20% a 500 µM
[Cu(C ₄ H ₆ N ₂ S) ₂ (fen)(H ₂ O) ₂]Cl ₂	IC ₅₀ = 300 µM

*FAc de germen de trigo

En relación a la fosfatasa alcalina, se sabe de reportes en la literatura que aquellos ligandos que posean como grupo funcional al tiol, consiguen inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, como es el caso del Mercapto

¹³⁴ C.M Che, F.M Siu. *Curr Opin Chem Biol.* **2010.** 14, 255-261.

¹³⁵ M. Valizadeh, G. Schenk, K. Nash, G.W Oddie, L.W Guddat, D.A Hume, J. Jersey, T.R Burke Jr, S. Hamilton. *Arch Biochem Biophys.* **2004.** 424, 154-162.

¹³⁶ G. Schenk, N. Mitić, G.R Hanson, P. Comba. *Coord Chem Rev.* **2013.** 257, 473-482.

¹³⁷ R.P McGeary, G. Schenk, L.W Guddat. *Eur J Med Chem.* **2014.** 76, 132-144.

¹³⁸ D. Feder, W.M Hussein, D.J Clayton, M.W Kan, G. Schenk, R.P McGeary, L.W Guddat. *Chem Biol Drug Des.* **2012.** 80, 665-674.

¹³⁹ C.C McLauchlan, J.D Hooker, M.A Jones, Z. Dymon, E.A Backhus, B.A Greiner, N.A Dorner, M.A Youkhana, L.M Manus. *J Inorg Biochem.* **2010.** 104, 274-281.

metilfosfonato (MMP)¹⁴⁰ con la FAL de *Escherichia Coli*. En este sentido, en nuestro grupo de trabajo, se pudo determinar cómo los complejos $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{fen})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2$ y $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2\text{H}_2\text{O}$ han sido capaces de inhibir la actividad FAL al igual que el metimidazol. Pero en los complejos (1) y (2) testeados no pudo registrarse ninguna inhibición, posiblemente la explicación a este comportamiento se deba al hecho de que el átomo de azufre no está disponible al estar comprometido en un puente sulfuro ó disulfuro en el ligando de metimidazol transformado, ya no es capaz de poder actuar como una base de Lewis que le permite coordinarse con el ión Zn(II) del sitio activo de la FAL⁵³, tal cual ocurre para el caso del complejo binario y ternario, en donde la presencia de grupo N-H libres sí le permite interaccionar con el sitio activo de la enzima.

4.3.3. Estimulación de la Fosfatasa alcalina por MgDMA.

Como se viene reafirmando, la fosfatasa alcalina es un componente importantísimo durante la formación de los tejidos duros y se encuentra altamente expresado en las células de estos tejidos. Esta enzima se encuentra entre los primeros genes funcionales más expresados en el proceso de calcificación. Por lo tanto, ejerce su acción durante las primeras etapas en el proceso de mineralización. El mecanismo por el cual ejerce su acción enzimática no está aún del todo claro, pero se sabe que actúa elevando la concentración de fosfato inorgánico, promueve la mineralización y disminuye la concentración extracelular de pirofosfato, un inhibidor de la formación mineral.

En los experimentos de ingeniería de tejidos existe un gran interés cuando los niveles de expresión celular de la fosfatasa alcalina son altos, porque es un buen indicio de mineralización en estos nuevos tejidos¹⁴¹. Al mismo tiempo esto proporciona posibles oportunidades terapéuticas para el tratamiento de enfermedades óseas.

Se podría direccionar la activación de la fosfatasa alcalina como una posible estrategia para generar una nueva clase de compuestos con actividad antiosteoporótica. Existen muchísimos estudios relacionados en este aspecto con la estimulación de la enzima. Por ejemplo la participación del ion Mg(II) en la regulación de la FAL de *E. Coli*¹⁴². En estos estudios se observa el incremento de la actividad enzimática en una relación 10:1 de Mg(II) /enzima (buffer veronal) que se mantiene hasta una relación 30:1¹⁴³. Se ha reportado que el agente anti-osteoporótico ranelato de estroncio (RS) puede aumentar la formación ósea por parte de las células osteoblásticas y éste a su vez puede disminuir la resorción ósea osteoclástica. Se sabe que el RS actúa aumentando la actividad de la fosfatasa alcalina tanto en las células precursoras de osteoblastos y en las células maduras osteoblásticas (marcador de diferenciación osteoclástica, síntesis de colágeno y la función osteoblástica), y

¹⁴⁰ K.M Holtz, B. Stec, J.K Meyers, S.M Antonelli, T.S Widlanski, E.R Kantrowitz. *Protein Sci.* **2000.** 9, 907-915.

¹⁴¹ E.E Golub, K. Boesze-Battaglia. *Curr Opin Orthop.* **2007.** 18(5), 444-448.

¹⁴² W.F Bosron, R.A Anderson, M.C Falk, F.S Kenedy, B.L Vallee. *Biochemistry.* **1977.** 16, 610-614.

¹⁴³ D.J Plocke, B.L Vallee. *Biochemistry.* **1962.** 1, 1039-1043.

además favorece la expresión de marcadores en los osteoblastos como la sialoproteína oséa (BSP) y la osteocalcina (OCN), dando como resultado un incremento *in vitro* de la osteogénesis¹⁴⁴. Fernández y colaboradores¹⁴⁵, han estudiado la interacción del RS y el Mg(II) con la actividad enzimática de la FAL. Los experimentos demostraron que en la FAL de las células osteoblásticas y en ausencia de Mg(II), el efecto estimulador del RS desaparece, mientras que en presencia del metal con RS ó SrCl₂ la actividad enzimática aumenta entre 15-66%.

Basándonos en el hecho de que existen muchas similitudes entre las distintas fosfatasas y la posibilidad de que los complejos de magnesio puedan comportarse como agentes anti-osteoporóticos, hemos analizado la influencia del compuesto MgDMA sobre la actividad de la enzima incluyendo experimentos que usan la sal de MgCl₂.

Para analizar los resultados, se aplicó el modelo cinético de Michaelis-Menten para obtener la constante K_m y así poder determinar si el nuevo compuesto a base de Mg(II), MgDMA, afecta la afinidad de la FAL por el sustrato p-NPP. Los resultados de los ensayos se ven en las Figura 27 y 28 y en la Tabla 4.

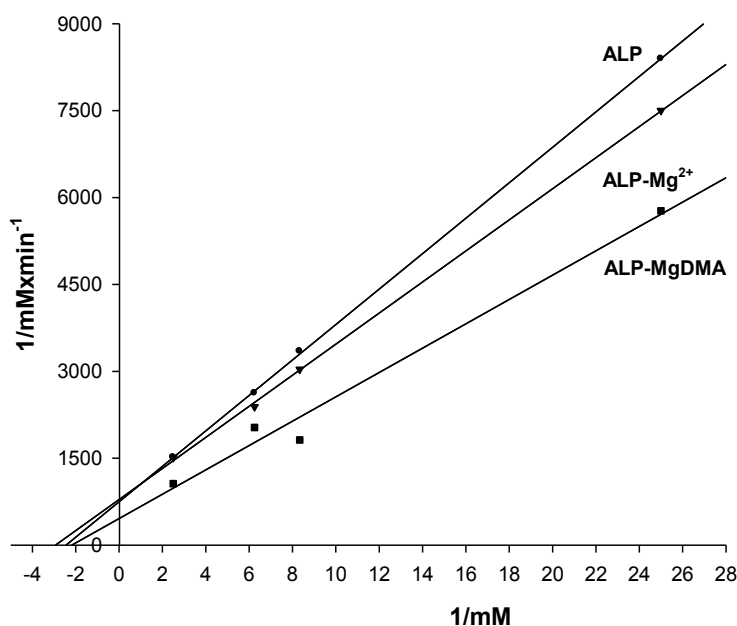


Figura 27. Curva de Lineweaver-Burk: $1/V = (K_m/V_{max})/[S] + 1/V_{max}$. Concentraciones: FAL = $6,25 \times 10^{-5}$ mM (coeficiente de correlación, $r^2 = 0,99$); FAL ($6,25 \times 10^{-5}$ mM)-Mg²⁺ (5 mM) ($r^2 = 0,99$) y FAL ($6,25 \times 10^{-5}$ mM)-MgDMA (5 mM) ($r^2 = 0,98$). Los datos son el promedio de cinco experimentos independientes.

El valor de K_m obtenido en los experimentos realizados revela la afinidad de la enzima por el sustrato y se sabe que, cuando más bajo sea este valor, mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato. Para el MgDMA el valor de K_m resultó ser del mismo orden que el valor de K_m del Mg(II) solo, pero la velocidad máxima (V_{max}) aumenta de forma sustancial para el complejo.

¹⁴⁴ Z. Saidak, P.J Marie. *Pharmacol Therapeut.* **2012.** 136, 216-226.

¹⁴⁵ J.M Fernández, M.S Molinuevo, A.D McCarthy, A.M Cortizo. *Biometals.* **2014.** 27, 601-607.

Si analizamos los valores obtenidos en el número de recambio y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m), puede proponerse que el compuesto en estudio estimula de manera eficiente la actividad enzimática (Tabla 4). Esta estimulación se relaciona con el aumento en el porcentaje de p-nitrofenol (PNP) generado a los 20 minutos de iniciada la reacción, este valor es un 53 % superior al porcentaje alcanzado para la FAL sin el agregado de MgDMA. En nuestras condiciones experimentales, el Mg(II) solo puede aumentar la producción de PNP pero su valor es menor que el del complejo

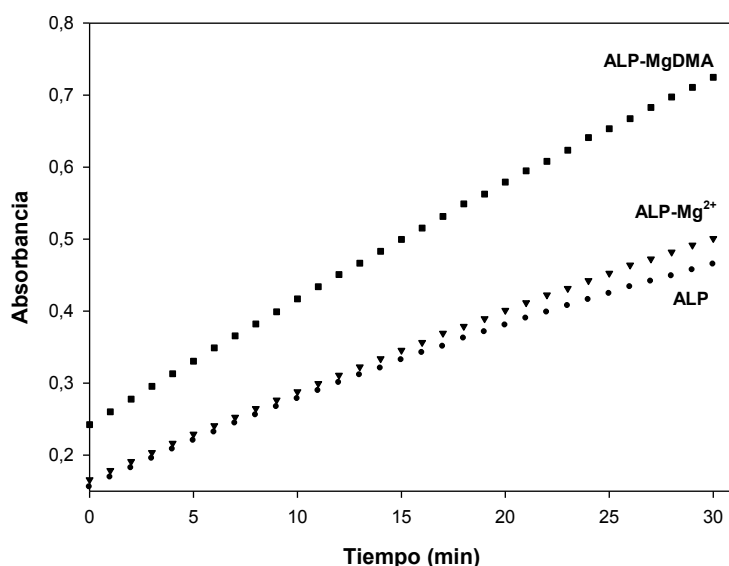


Figura 28. Absorbancia vs tiempo de p-nitrofenol (PNP) a 405 nm ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) medidas cinéticas de la FAL. Concentraciones: FAL = $6,25 \times 10^{-5} \text{ mM}$; para los sistemas FAL ($6,25 \times 10^{-5} \text{ mM}$) - g^{2+} (5 mM) y FAL ($6,25 \times 10^{-5} \text{ mM}$) -MgDMA (5 mM). PNPP = 0,4 mM. Los datos son el promedio de cinco experimentos independientes.

Tabla 4. Actividad FAL: parámetros cinéticos de la FAL, de los sistemas FAL-Mg²⁺ y FAL-MgDMA y % PNP a los 10 minutos del tiempo de reacción.

	FAL	FAL-Mg ²⁺	FAL-MgDMA
V_{max} (mM.min⁻¹)	1,34x10 ⁻³	1,27x10 ⁻³	1,73x10 ⁻³
K_m (mM)	0,41	0,34	0,36
k_{cat} (min⁻¹)	21,4	20,3	27,7
k_{cat}/K_m (M⁻¹ min⁻¹)	52,2	59,7	76,9
% PNP*	-	+6%	+53%
% Selectividad**	5	5,4	7,8

* Aumento en la concentración de PNP (%) a los 20 minutos del tiempo de reacción calculados en relación a la FAL.

**% Selectividad = moles de PNP/moles de PNPP x 100 a los 20 min del tiempo de reacción PNPP = 0,4 mM.

Puede verse que la selectividad de la FAL aumenta 1,5 veces. Para poder comprender como ejerce su acción el MgDMA sobre la enzima, es necesario realizar un análisis más profundo para obtener una mejor interpretación y saber cómo es el mecanismo de acción del compuesto y como este influye en la modificación de la estructura de la enzima, lo cual trae como resultado final una mejora de su eficiencia catalítica.

4.4. Simulación de actividad de las peroxidasas

Las peroxidasas (POX, EC.1.11.1.X) son enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos usando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. Estas son glicoproteínas con una amplia distribución en la naturaleza y son producidas por un gran número de microorganismos, animales y plantas.

Las POX tienen gran utilidad en muchos campos de aplicación: para el desarrollo de inmunoensayos, en la construcción de biosensores, en síntesis orgánica estereoespecífica, como desintoxicadoras de suelos, intervienen en procesos de biorremediación, se emplean como decolorantes en la industria papelería, pueden utilizarse para determinar glucosa, alcoholes, glutamato, ácido úrico, colesterol, lactosa, entre otras¹⁴⁶. La POX más ampliamente utilizada en diagnóstico médico es la proveniente del rábano por su alta estabilidad.

El gran inconveniente que se presenta durante el transcurso de obtención y purificación natural de estas enzimas, es que el proceso tiene una relación costo beneficio muy alto, y también se suma el hecho de que son muy sensibles al ambiente desnaturalizándose. Es por ello que pierden su eficiencia catalítica. Por estas desventajas hay un gran interés en desarrollar compuestos con actividad peroxidasa mimética, ya que estas enzimas presentan una gran potencial de aplicación en diversas áreas: industrial, biotecnología, alimentos y en salud.

Si bien el cobre y sus compuestos han demostrado participar en diversos procesos catalíticos, no han sido investigados hasta ahora en profundidad en relación a la actividad mimética peroxidasa. Existen ejemplos muy selectos de estos compuestos; algunos de ellos se han diseñado con el fin de desarrollar sensores que detecten muestras específicas (fosfatasa alcalina¹⁴⁷, glifosato¹⁴⁸, patogénesis bacteriana¹⁴⁹). Existe gran interés en la potencial aplicación de estos compuestos en el área de la biotecnología, y en la medicina especialmente para su uso en el diagnóstico médico¹⁵⁰.

¹⁴⁶ M. Hamid. K-ur.Rehman. *Food Chem.* **2009**. 115(4), 1177-1186.

¹⁴⁷ C. Wang, J. Gao, Y. Cao, H. Tan. *Anal Chim Acta.* **2018**. 1004, 74-81.

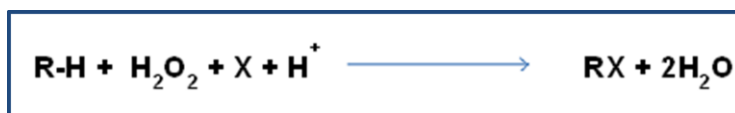
¹⁴⁸ Y. Chang, Z. Zhang, J. Hao, W. Yang, J. Tang. *Sens Actu B.* **2016**. 228, 410-415.

¹⁴⁹ S. Wang, W. Deng, L. Yang, Y. Tan, Q. Xie, S. Yao. *ACS Appl Mater Interf.* **2017**. 9(2), 4440-4445.

¹⁵⁰ D.F Chai, Z. Ma, H. Yan, Y.F Qiu, H. Liu, H.D. Guo, G-G. Gao. *RSC Adv.* **2015**. 55, 78771-78779.

En la naturaleza existen compuestos con halógenos, como antibióticos, drogas o moléculas de señalización y mucho de estos se han aislado de macroalgas marinas^{151,152}. Los productos halogenados poseen comúnmente bromo o cloro y estos se hallan formando parte de una amplia diversidad de estructuras químicas que abarcan compuestos alifáticos, fenólicos, alcaloides, policétidos y oligopéptidos¹⁵³. Cuando se tiene un enlace carbono-bromo, la molécula adquiere propiedades únicas, por ejemplo cuando el bromo actúa como sustituyente esto permite aumentar la liposolubilidad de una molécula orgánica, y así mejora sus propiedades como emulsionante, insecticida o la actividad biológica de un compuesto^{154,155}.

Las haloperoxidasas son las enzimas encargadas de halogenar a distintos sustratos orgánicos mediante una reacción de halogenación electrofílica en presencia de peróxido de hidrógeno y un haluro:



X puede ser Cl^- , Br^- o I^-

Estas enzimas se clasifican por el ion haluro más electronegativo que pueden oxidar. Una cloroperoxidasa puede, por ejemplo, oxidar Cl^- , Br^- e I^- , mientras que una bromoperoxidasa puede oxidar Br^- e I^- pero no Cl^- . Hoy en día, se conocen dos tipos de haloperoxidasas: las haloperoxidasas dependientes del grupo Hemo¹⁵⁶ y las haloperoxidasas dependientes de vanadio^{157,158}, encontradas mayormente en organismo marinos. Como sugieren sus nombres, difieren con respecto al grupo prostético y, en consecuencia, en sus mecanismos catalíticos. Las haloperoxidasas dependientes del grupo Hemo utilizan una especie Fe(IV)-porfirina + (compuesto I) formada a partir del estado de reposo del grupo hemo y H_2O_2 para oxidar haluros, mientras que las haloperoxidasas dependientes de vanadio usan una especie de peroxo-vanadato (formada por la reacción con H_2O_2) para la misma transformación, ver la Figura 29.

En la sección 4.1 hemos discutido la inhibición sobre la enzima tiroideoperoxidasa (TPO), dependiente de iodo. En esta sección se discutirán las haloperoxidasas dependientes de bromo y un modelo de peroxidasa a través de la reacción de oxidación de pirogalol a purpugalina

¹⁵¹ R. Sander, W.C Keene, A.A.P Pszenny, R. Arimoto, G.P Ayers, E. Baboukas, J.M Cainey, P.J Crutzen, R.A Duce, G. Hönninger, B.J Huebert, W. Maenhaut, N. Mihalopoulos, V.C Turekian, R. Van Dingenen. *Chem Phys.* **2003**. 3, 1301-1307.

¹⁵² H. Herrmann, Z. Majdik, B. Ervens, D. Weise. *Chemosphere.* **2003**. 52, 485-502.

¹⁵³ G.W. Gribble. *Chemosphere.* **2003**. 52, 289-297.

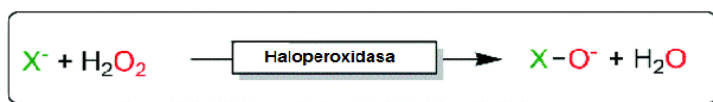
¹⁵⁴ D.L. Turner. *J Food Sci.* **1972**. 37, 791-792.

¹⁵⁵ D.A. Laskowski. *Rev. Environ. Contam Toxicol.* **2002**. 174, 49-170.

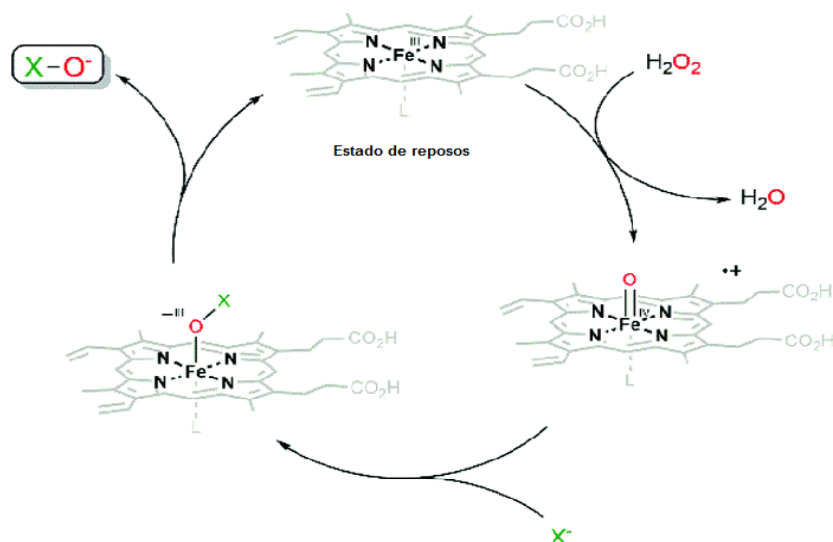
¹⁵⁶ M. Hofrichter, R. Ullrich. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2006**. 71, 276-288.

¹⁵⁷ R. Wever, M.A van der Horst. *Dalton Trans.* **2013**. 42, 11778-11786.

¹⁵⁸ C. Leblanc, H. Vilter, J.B Fournier, L. Delage, P. Potin, E. Rebuffet, G. Michel, P.L Solari, M.C Feiters, M. Czjzek. *Coord Chem Rev.* **2015**. 301-302, 134-146.



A) Haloperoxidasas Hemo dependientes



B) Haloperoxidasas V-dependientes

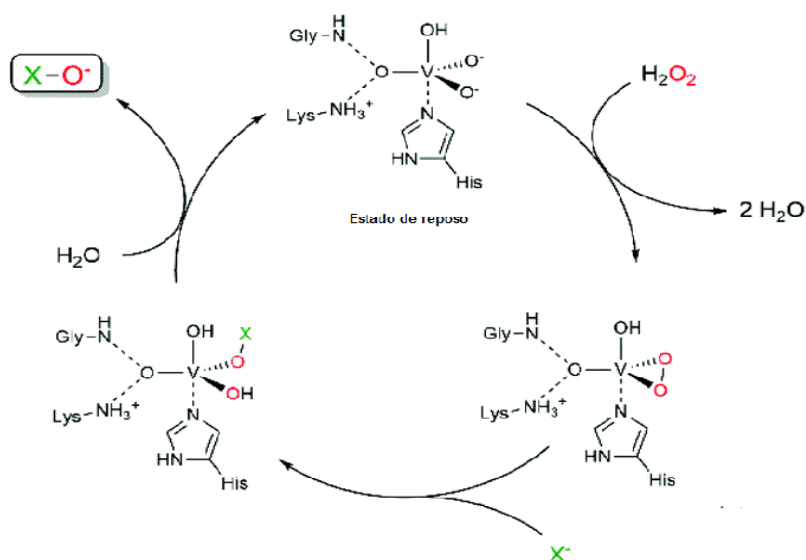


Figura 29. Mecanismo simplificado de oxidación de haluros por haloperoxidasas¹⁵⁹.

Las haloperoxidasas son muy difíciles de obtener naturalmente y además su aplicación se ve restringida porque su baja estabilidad y actividad. Por estas razones se tratan de sintetizar complejos metálicos miméticos eficientes con actividad de haloperoxidasa. Mucho de los complejos metálicos de cobre que se han reportado poseen actividad SOD símil de la SOD natural; sin embargo

¹⁵⁹ G.T Höfler, A. But, F. Hollmann. *Org Biomol Chem.* **2019.** 17, 9267-9274.

existe poca información en la literatura sobre la actividad catalítica de bromación en complejos de cobre.

4.4.1. Modelos *in vitro* seleccionados: fundamento

4.4.1.1. Rojo fenol

Para determinar la actividad peroxidasa de los complejos de cobre sintetizados se uso la técnica de rojo fenol. Los ensayos fueron realizados según la técnica descrita en el capítulo 7.6. El fundamento de la técnica consiste en la oxidación del rojo fenol a azul de bromofenol en presencia de H_2O_2 a $\text{pH} = 7$ y 25°C (Figura 30).

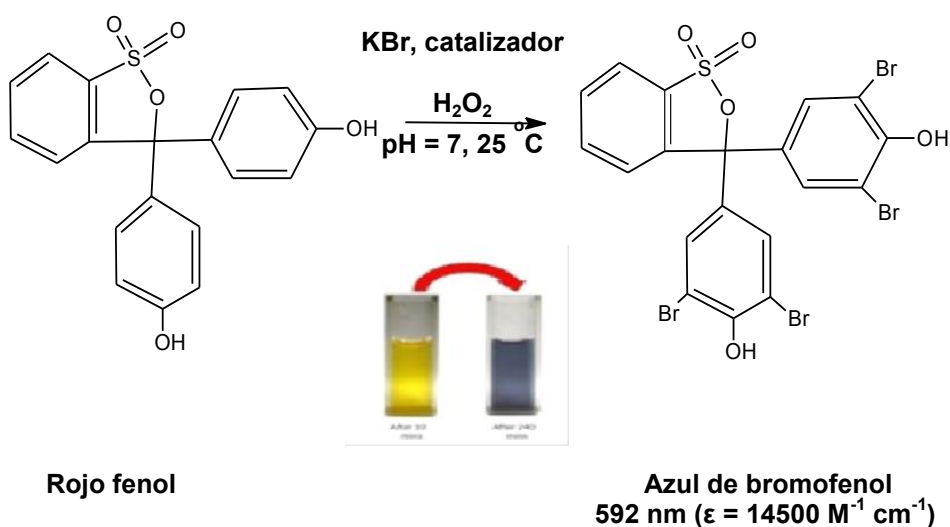


Figura 30. Reacción de bromación del rojo fenol, catalizada por los complejos de Cu(II) .

4.4.1.2. Oxidación del pirogalol

Por otra parte, buscando otros sistemas modelos encontramos un modelo de reacción basado en la oxidación del pirogalol a purpurogalina ($\text{pH} = 7$) (Figura 31).

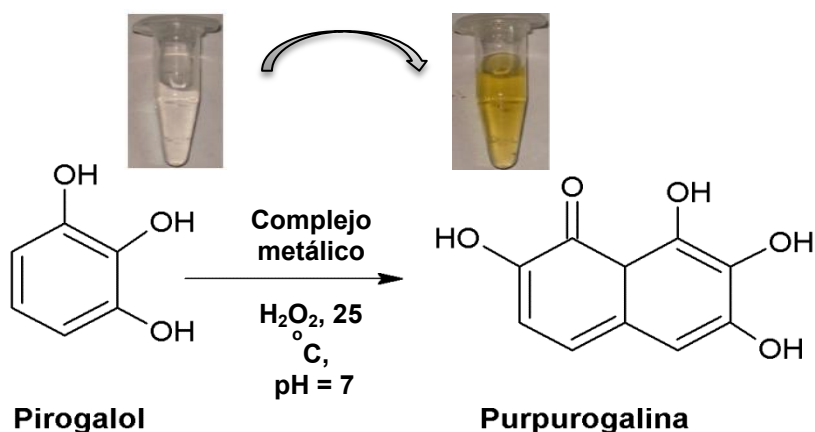


Figura 31. Reacción de oxidación de pirogalol.

4.4.2. Simulación de la actividad peroxidasa por parte del complejo (SerH₂)₂[CuCl₄]

Son bien reconocidas las actividades catalíticas descubiertas por compuestos conteniendo cobre^{160,161}. En particular, los halocupratos son conocidos por ser precursores catalíticos de muchos procesos de transferencia electrónica¹⁶²; también son utilizados como inhibidores del crecimiento de cepas bacterianas y fúngicas¹⁶³.

Por otro lado, existen complejos de cobre anclados a polímeros que son muy selectivos para la oxidación de etilbenceno a acetofenona¹⁶⁴. Otro aspecto relevante es su uso como sales farmacéuticamente aceptables para controlar las infecciones producidas por helmintos y mejorar el crecimiento en animales¹⁶⁵.

En base a esta información, y como resultado del comportamiento del complejo de cobre en presencia de iodo, se consideró probar la actividad catalítica de este complejo en las reacciones de bromación que simulan la acción de las haloperoxidasas. Los complejos metálicos son modelos bien reconocidos de las V-haloperoxidasas, especialmente los complejos de vanadio¹⁶⁶.

La actividad mimética peroxidasa se evaluó de acuerdo a la técnica Zhang-Peng *et al*¹⁶⁷. En este método, se siguió la acción del complejo sobre la bromación del rojo fenol (sustrato orgánico usado). Cuando es agregado el complejo de tetraclorocuprato de sertralonio, a la mezcla de reacción que contiene bromuro y rojo fenol (buffer fosfato pH = 5,8) la misma produce un viraje de color en la solución de amarillo a azul. Este cambio es registrado en los espectros electrónicos UV-Vis como un incremento en la intensidad de la banda localizada a 592 nm para el bromofenol (producto de color característico azul) y una disminución de la banda característica del rojo fenol localizada a 443 nm debido a la desaparición del mismo (Figura 32A).

Con la finalidad de encontrar la cantidad óptima de catalizador, se evaluaron en un inicio, diferentes concentraciones. Cantidades de catalizador superiores a 0,007 g, provocaban reacciones casi inmediatas de cambio de color. Por tal motivo la cantidad de catalizador más baja aceptable que optimizó las condiciones de reacción fue de 0,007g de compuesto.

En las condiciones experimentales usadas, se considera que la actividad mimética bromoperoxidasa tiene una cinética de reacción de *pseudo* primer orden. En ese sentido se expresaron los datos obtenidos en una gráfica de ln

¹⁶⁰ D.W Smith. *Coord Chem*. **1976**. 21, 93-158.

¹⁶¹ C. Mcalister, F. Wadsworth. **1970**. (United States Patent: US3758619).

¹⁶² M. Amini, M. Nikkhoo, S.M.F Farnia. *Appl Organometal Chem*. **2017**. 31(9), 1-5.

¹⁶³ N. Dhanam, A. Thamarachelvan. *Int J ChemTech Research*. **2015**. 8, 249-260

¹⁶⁴ M.R Maurya, S. Sikarwar, T. Joseph, P. Manikandan, S.B Halligudi. *React Funct Polym*. **2005**. 63, 71-83.

¹⁶⁵ R.L Klingbail. **1968**. (United States Patent: US3408444).

¹⁶⁶ A.G.J Ligtienberg, R. Hage, B.L Fering. *Coord Chem Rev*. **2003**. 237, 89-101.

¹⁶⁷ X.D Feng, R. Zhang, X.Y Wang, X.X Zhang, J.X Wang, Y.H Xing, L.X Sun. *Polyhedron*. **2015**. 90, 69-76.

($[A]/[A_0]$) en función del tiempo (Figura 32B), en donde A y A_0 son las absorbancias a 592 nm, medidas en el tiempo t , $t \rightarrow \infty$, y $t = 0$, respectivamente.

Como puede verse, la gráfica presenta un comportamiento lineal y del promedio de diferentes conjuntos de experimentos, los valores obtenidos para la constante de velocidad de pseudo primer orden k y el tiempo de vida media $t_{1/2}$ fueron $0,157 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$ y 4,41 min, respectivamente.

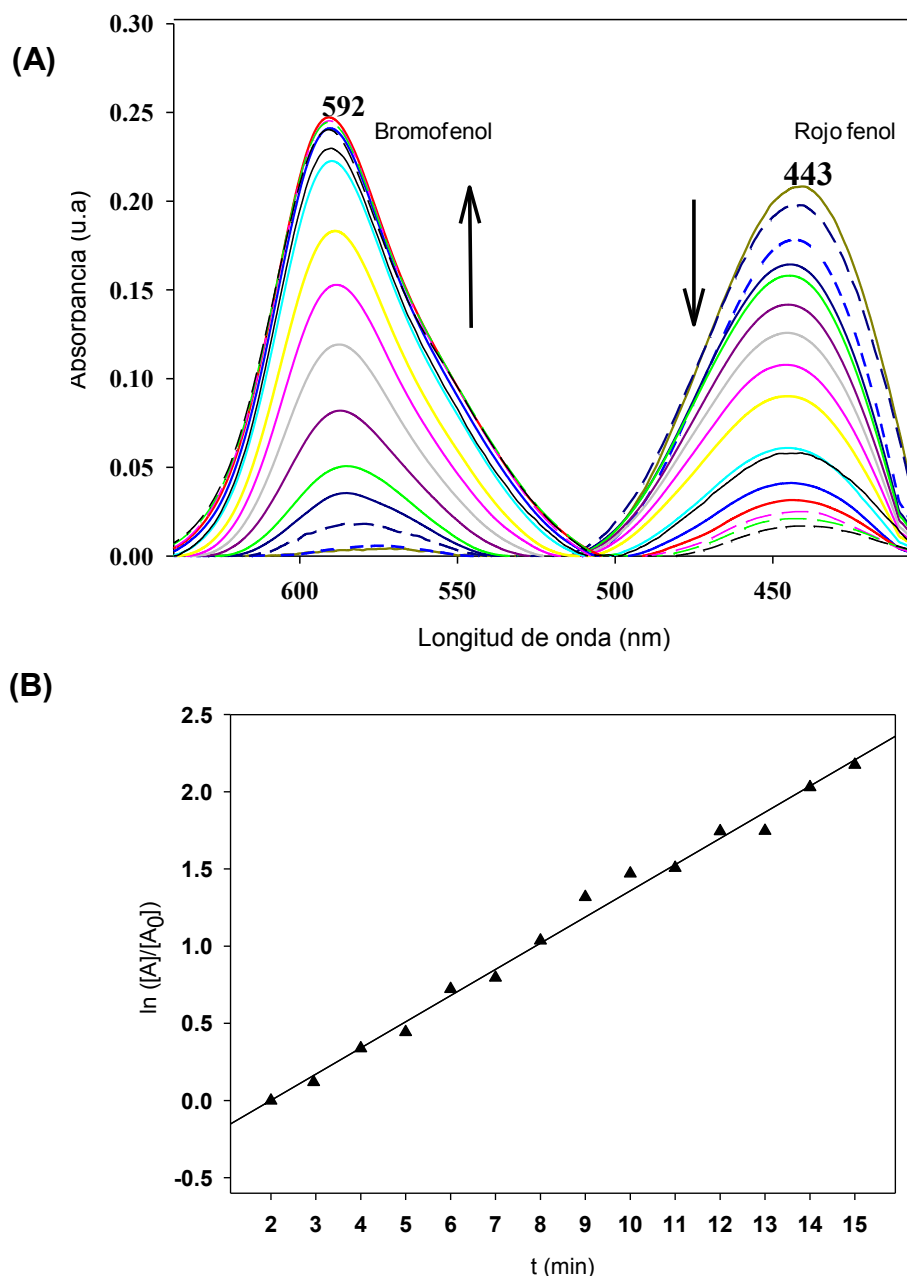


Figura 32. (A) Bromación oxidativa del rojo fenol catalizado por el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (0,04 mmol). Los espectros fueron tomados a intervalos de tiempo de un minuto. Los datos se obtienen a pH = 5,8 (solución acuosa de buffer fosfato), $[\text{KBr}] = 2\text{M}$, $[\text{Rojo fenol}] = 20 \mu\text{M}$, $[(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]] = 7,38 \mu\text{M}$. **(B)** Gráfica de $\ln([A]/[A_0])$ vs. tiempo, donde A y A_0 son las absorbancias medidas a 592 nm, durante el tiempo t , $t \rightarrow \infty$, y $t = 0$. Los valores se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

Los resultados confirman que el complejo se comporta con actividad mimético bromoperoxidasa; y que podría estar asociado a un mecanismo de acción antitiroideo. Como se explicara anteriormente, no inhibiría de forma directa a la enzima sino que lo hace indirectamente cuando es capaz de reducir al sustrato H_2O_2 (generado de forma endógena por la enzima oxidasa tiroidea) y evita de esta manera la oxidación del átomo de hierro en la LPO¹⁶⁸.

4.4.3. Simulación de la actividad Peroxidasa por parte de complejos derivados de Cu y metimidazol.

4.4.3.1. Rojo fenol (Bromoperoxidasa)

Como en toda actividad cinética, antes de efectuar las medidas, se buscaron las condiciones óptimas para la misma. En primer lugar se buscó la cantidad de compuesto que genere una cinética de reacción óptima para una cierta cantidad de tiempo y así poder medir la actividad peroxidasa ya que se llegaba a la saturación muy rápidamente. Una vez fijada esta cantidad (Complejo 1 = 2,5 μ M; complejo 2 = 1 μ M), se hicieron las medidas variando la concentración del sustrato (rojo fenol) y los resultados fueron graficados en curvas de absorbancia a 592 nm del producto formado (azul de bromofenol) versus el tiempo de reacción (Figura 32 A y B, izquierda).

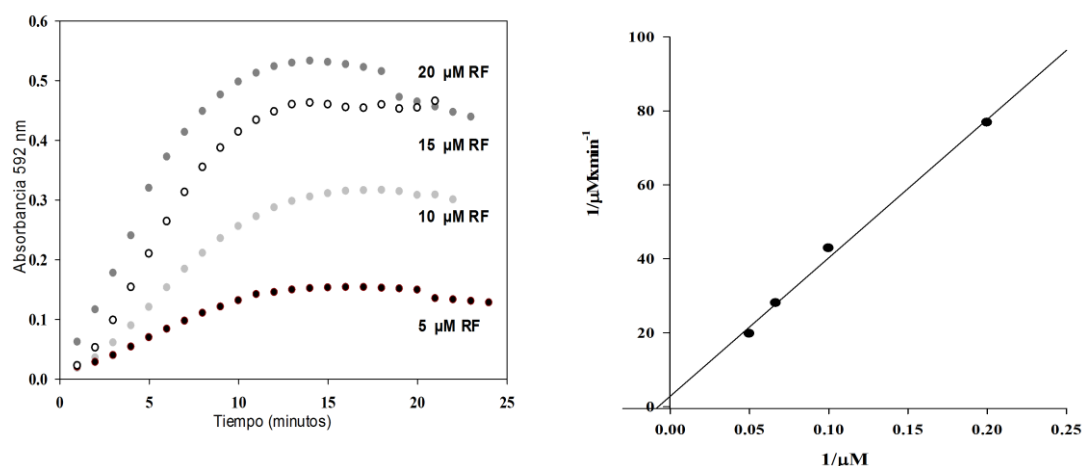
De las curvas se observa que los dos complejos de cobre siguen una cinética de saturación en la reacción y presentan un comportamiento cinético de Michaelis-Menten en función de la concentración del rojo fenol. Los valores de la constante de unión de Michaelis (K_m), la velocidad máxima (V_{max}) y constante catalítica de la enzima (k_{cat}) se calcularon a partir del gráfico de Lineweaver-Burk. (Sección experimental).

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de Lineweaver-Burk (Figura 33 A y B, derecha) de los complejos de cobre se muestran en la Tabla 5, junto con algunos ejemplos de bibliografía reportados para algunos compuestos de Cu(II), incluyendo al caso más estudiado que es la peroxidasa de rábano.

Desafortunadamente, no pudo hacerse una comparación directa entre los datos obtenidos con los reportados, porque las condiciones experimentales en ambos casos no son las mismas (tipo de sustrato y concentraciones usadas). Sin embargo, pueden destacarse que en las condiciones empleadas en este trabajo, el complejo(2) se comporta como un mejor catalizador respecto al complejo(1), ya que presenta una mejor afinidad por el sustrato (rojo fenol) debido a que el valor de $K_m = 11,76 \times 10^{-6}$ M es cien veces menor que el del complejo(1) ($K_m = 1,34 \times 10^{-3}$ M).

¹⁶⁸ A.P Ramos Costa, C. Vieira, L.O.L Bohnher, C. Felisbino Silva, E.C da Silva Santos, T.C Monteiro De Lima, C. Lino-de-Oliveira. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*. **2013**. 45, 150-155.

(A)



(B)

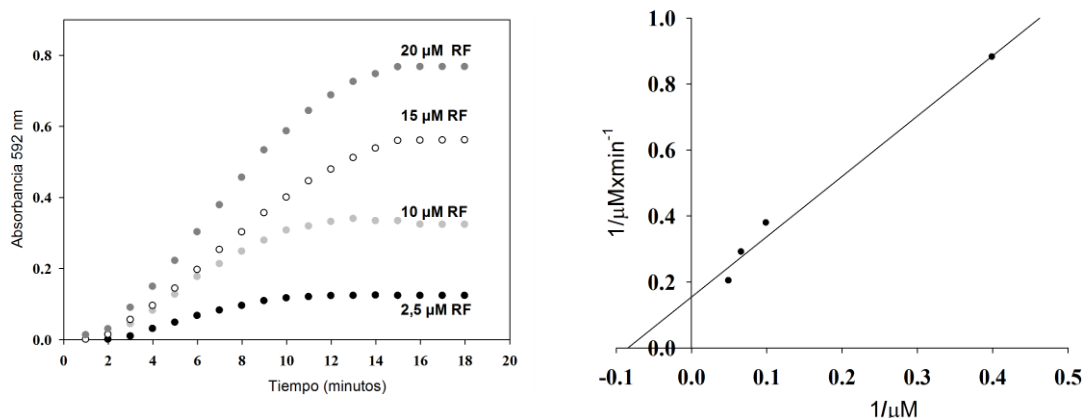


Figura 33. Bromación del rojo fenol catalizada por los complejos de cobre: (Izquierda: Curva de Absorbancia del bromofenol versus tiempo; derecha: gráfica de Lineweaver-Burk: $1/V = K_m/V_{\max}(1/[S] + 1/V_{\max})$). **(A):** $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ y **(B):** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$.

Cabe aquí mencionar que la constante de Michaelis K_m es indicativa de la afinidad que posee la enzima por el sustrato, siendo ésta mayor, cuanto menor es K_m . Por otro lado, el complejo(2) demostró tener mayor velocidad enzimática que se refleja en el número de recambio ($K_{\text{cat}} = 6,45 \text{ min}^{-1}$) otorgándole una mayor eficiencia catalítica ($K_{\text{cat}}/K_m = 5,48 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) que el complejo(1) (Tabla 5).

La eficacia de la actividad símil-haloperoxidasa del complejo(2) respecto del complejo(1) puede explicarse si se tiene en cuenta su estructura piramidal. Esa diferencia estructural sería probablemente la que le da mayor accesibilidad al sustrato. Se sabe que la peroxidasa de rábano HRP y las haloperoxidasas de vanadio¹⁶⁹ son capaces de catalizar la bromación del mismo tipo de sustratos.

¹⁶⁹ R. Li, Y. Zhou, L. Zou, S. Li, J. Wang, C. Shu, C. Wang, J. Ge, L. Ling. *Sens Actuators B* **2017**. 245, 656-664.

Ese efecto catalítico puede relacionarse con la estructura del sitio activo de ambas que resulta ser un entorno pentacordinado, ya sea conteniendo al grupo hemo (FeN5) para HRP ó con un átomo central de V(V) en una geometría trigonal bipiramidal, en el caso de las haloperoxidasas.

Tabla 5. Parámetros cinéticos para la bromación del rojo fenol
[Cu(C₄H₅N₂S)₂Cl₂].2H₂O(1) (2,5 μM) y [Cu(C₈H₁₀N₄S)SO₄H₂O](2) (1 μM).

[Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂].2H ₂ O (1)	V _{max} (M. min ⁻¹)	K _m (M)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ .min ⁻¹)
	3,47 x 10 ⁻⁷	1,34 x 10 ⁻³	0,14	104,5
Conversión (%)	Rojo fenol (mM)	TON ^b	TOF ^c (h ⁻¹)	
61,62	5	3,21	19,25	
47,83	10	8,47	50,81	
55,40	15	11,03	66,17	
71,08	20	16,17	97,04	

[Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ H ₂ O] (2)	V _{max} (M.min ⁻¹)	K _m (M)	k _{cat} (min ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M ⁻¹ .min ⁻¹)
	6,45 x 10 ⁻⁶	11,76 x 10 ⁻⁶	6,45	5,48x10 ⁵
Conversión (%)	Rojo fenol (mM)	TON ^a	TOF (h ⁻¹)	
61,11	2,5	8,25	49,53	
33,05	10	21,96	131,79	
33,07	15	30,72	184,34	
27,94	20	44,36	266,19	

^a Porcentaje de conversión del rojo fenol (promedio de tres ensayos diferentes usando siempre soluciones recién preparadas de catalizador).

^b TON= Número de recambio (número de moles de producto/números de moles de catalizador).

^c TOF= Frecuencia de recambio (h⁻¹, moles de sustrato convertidos por mol de catalizador por hora).
Valores calculados a los 10 minutos de la reacción.

Si bien, como dijimos, no puede hacerse una comparación directa por la diferencia en el tipo de técnicas empleadas, teniendo en cuenta los ejemplos presentados en la Tabla 6, el complejo(1) tiene un valor de K_m comparable con el de los polimetallatos (BiW₉Cu₃)¹⁵⁴, Cu-MOFs¹⁷⁰ y Cu(II)-triazina¹⁷¹, es decir estructuras más complejas y posiblemente se deba a la presencia del ligando disulfurado alrededor del metal central.

¹⁷⁰ Lo SM-F, S.S.Y Chui, L.Y Shek, Z. Lin, X.X Zhang, G.H Wen, I.D Williams. *J Am Chem Soc.* **2000.** 122, 6293-6294.

¹⁷¹ Y. Xiong, Y. Qin, L. Su, Ye. *Chem Eur J.* **2018.** 24, 1-12.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la actividad peroxidasa de compuestos con comportamiento cinético de Michaelis-Menten.

Compuesto	K_m (M)	$V_{m\acute{a}x}$ (M.s ⁻¹)	Método
[Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂].2H ₂ O(1)	1,34 x 10 ⁻³	6 x 10 ⁻⁹ (3,48 x 10 ⁻⁹ M.min ⁻¹)	Rojo fenol
[Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ H ₂ O](2)	11,76 x 10 ⁻⁶	1,08 x 10 ⁻⁷ (6,45 x 10 ⁻⁶ M.min ⁻¹)	Rojo fenol
Cu-MOFs (CuCl ₂ /4,4'-bipiridina)	1,78 x 10 ⁻³	0,28 x 10 ⁻⁶	ABTS ¹⁷²
Cu-MOFs (CuCl ₂ /4,4'-bipiridina)	0,37 x 10 ⁻³	25,23 x 10 ⁻⁶	H ₂ O ₂ ²⁸
CuNCs (nanopartículas)	1,38 x 10 ⁻⁶		TMB ¹⁷³
CuNCs (nanopartículas)	8,90 x 10 ⁻⁶		H ₂ O ₂ ²⁹
BiiW ₉ Cu ₃ (híbrido)	0,36 x 10 ⁻³	1,43 x 10 ⁻⁸	TMB ¹⁵⁴
CCTF-1(Cu(II)-triazina)	0,42 x 10 ⁻³	9,4 x 10 ⁻⁸	TMB ¹⁷⁴
HRP	2,72 x 10 ⁻⁶		H ₂ O ₂
HRP	2,48 x 10 ⁻⁵	2,5 x 10 ⁻⁵	TMB ²⁸
HRP	0,34 x 10 ⁻³	5,46 x 10 ⁻⁶	H ₂ O ₂ ¹⁷⁵
	3,07 x 10 ⁻⁵	1,49 x 10 ⁻⁵	ABTS ¹⁷⁶

HRP Peroxidasa de rábano picante, TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, ABTS 2,2'-Azinobis(3-etil-benzotiazolina-6-acido sulfónico) diamonio sal

Otra observación relevante que puede realizarse es la relacionada a los porcentajes de conversión. Lo que se ve para el complejo(1) es que no hay diferencias significativas en el porcentaje de conversión a los 10 minutos de iniciada la reacción. En el caso del complejo(2); la mayor conversión es alcanzada cuando la concentración del sustrato Rojo Fenol es de 2,5 µM, observándose que para los otros valores de concentración no hay diferencias sustanciales; llegando a una saturación del sistema (Tabla 5, Figura 34).

¹⁷² C. Wang, J. Gao, Y. Cao, H. Tan. *Anal Chim Acta*. **2018**. 1004, 74-81.

¹⁷³ Z. Yan, Q. Niu, M. Mou, Y. Wu, X. Liu, S. Liao. *J Nanopart Res*. **2017**. 19, 1-12.

¹⁷⁴ M.R Maurya, N. Chaudhary, F. Avecilla, I. Correia. *J Inorg Biochem*. **2015**. 147, 181-192

¹⁷⁵ R. Li, Y. Zhou, L. Zou, S. Li, J. Wang, C. Shu, C. Wang, J. Ge, L. Ling. *Sens Actuators B*. **2017**. 245, 656-664.

¹⁷⁶ M.R Maurya, B. Uprety, F. Avecilla. *Eur J Inorg Chem*. **2016**. 4802-4803.

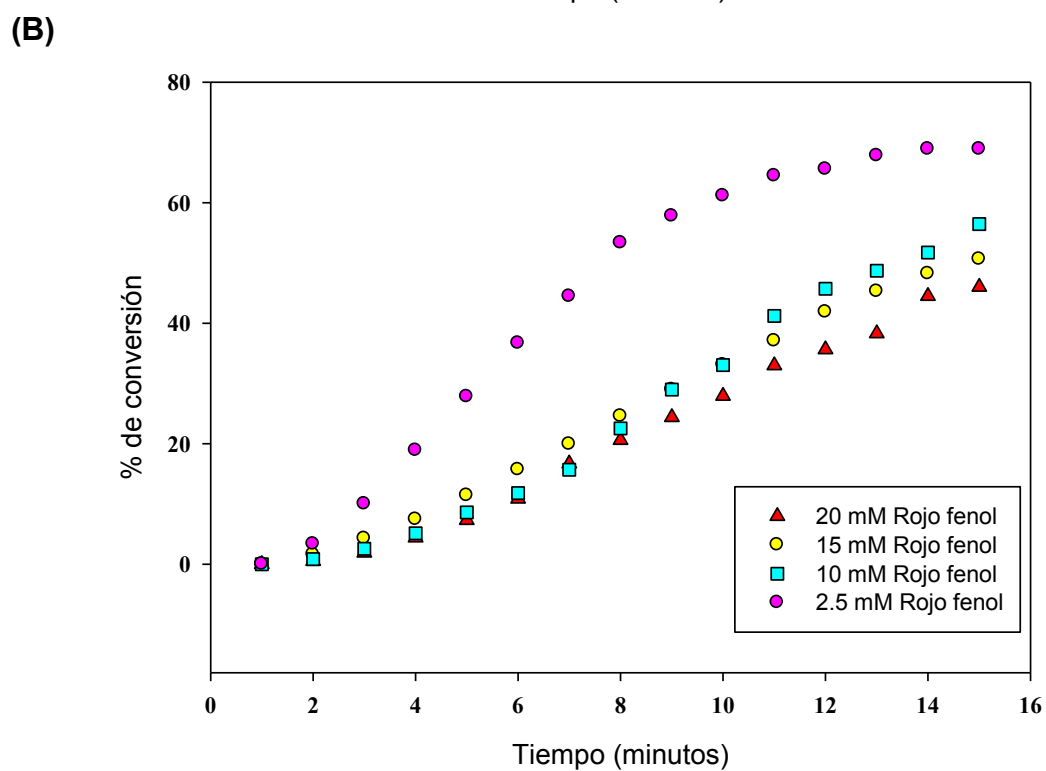
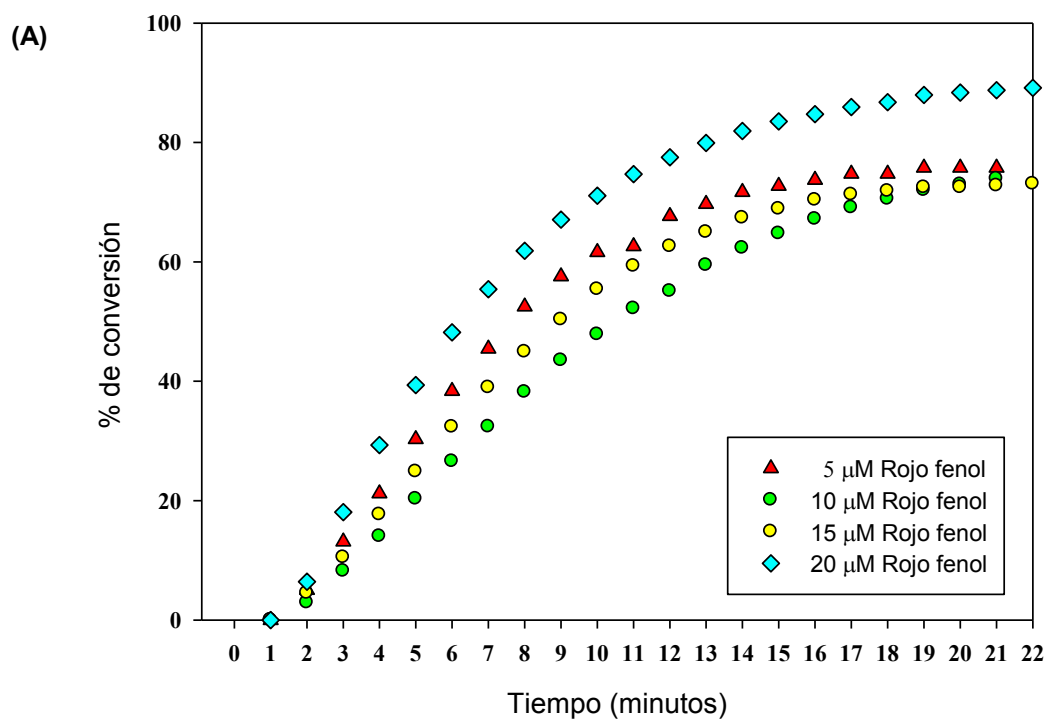


Figura 34. % Porcentajes de conversión vs tiempo: **(A)** $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$ ($2,5 \mu\text{M}$) y **(B)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$ ($1 \mu\text{M}$).

4.4.3.2. Oxidación del pirogalol

Existe evidencia en la literatura de la existencia de complejos de oxidovanadio(IV)¹⁷⁷ y dioxidomolibdeno(VI)¹⁷⁸ que se comportan como catalizadores heterogéneos de la oxidación mediada por peróxido del pirogalol.

También se hace referencia a que este sustrato es utilizado por la pirogalol-floroglucinol transhidroxilasa para formar la floroglucinol. Esta información fue la razón que nos llevó a estudiar la viabilidad de este proceso de oxidación con los complejos de cobre sintetizados.

Cuando se probaron estos complejos se observa que la oxidación del pirogalol se ve incrementada a medida que la cantidad de catalizador va en aumento. En general, esto conlleva a que el tiempo de reacción total disminuya. Por esta razón existe un compromiso entre el tiempo de reacción, la cantidad de catalizador y sustrato a usar, para así poder optimizar las condiciones de reacción.

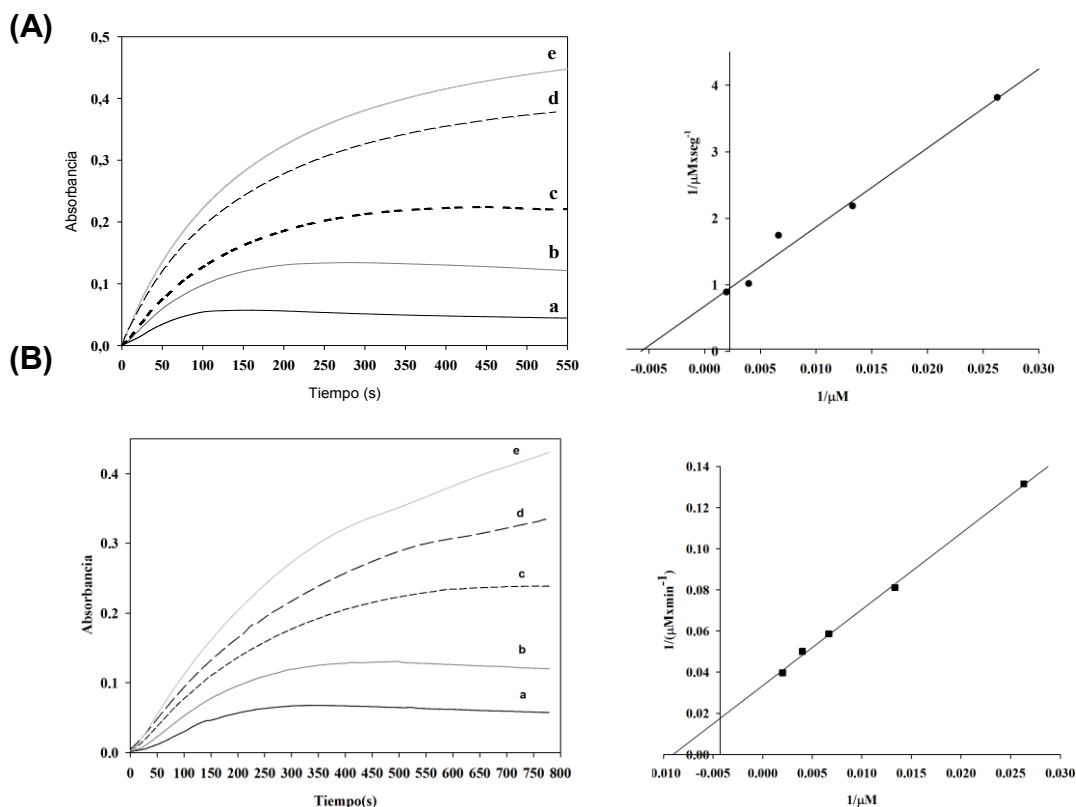


Figura 35. Oxidación del Pirogalol. Izquierda: Curva de Absorbancia (420 nm) versus tiempo (segundos), variando la concentración de pirogalol (a = 0,038, b = 0,075, c = 0,15, d = 0,25, e = 0,5 mM) y manteniendo constante la cantidad de H_2O_2 y catalizador. Derecha= Gráfica de Lineweaver-Burk: $1/V = K_m/V_{m\acute{a}x}(1/[S] + 1/V_{m\acute{a}x})$. (A): $[Cu(C_4H_5N_2S)_2Cl_2] \cdot 2H_2O(1)$ (1,7 μM) y (B): $[Cu(C_8H_{10}N_4S)SO_4H_2O](2)$ (20 μM).

¹⁷⁷ M.R Maurya, N. Chaudhary, F. Avecilla, I. Correia. *J Inorg Biochem.* **2015.** 147,181-192.

¹⁷⁸ M.R Maurya, B. Uprety, F. Avecilla. *Eur J Inorg Chem.* **2016.** 2016(9), 4802-4813.

Cuando se probó el complejo(1) se observó que la reacción de oxidación fue rápida. De hecho, con concentraciones muy pequeñas se ponía de manifiesto su actividad catalítica (1,7 μM). Por ese motivo, si bien el efecto catalizador de los complejos fue evaluado con distintas cantidades ésta última fue la seleccionada.

Para el complejo(2) se necesitó un valor de concentración (20 μM) mayor respecto al complejo(1), para analizar la actividad catalítica. Los resultados experimentales obtenidos se presentan en la Figura 35.

Para poder tener una mejor comprensión de la actividad peroxidasa mimética de nuestros compuestos, los parámetros cinéticos como la V_{max} y K_m y K_{cat} fueron calculados aplicando el enfoque de Michaelis-Menten. Los valores obtenidos constan en la (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de la oxidación de pirogalol para $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) (1,7 μM) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2) (20 μM).

$[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)	V_{max} ($\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)	K_m (M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
	$7,76 \times 10^{-5}$	$1,48 \times 10^{-4}$	45,66	308153,02
		Pirogalol	TON	TOF (h^{-1})
		0,50	19,15	4524,18
		0,25	17,23	4069,94
		0,15	12,83	3030,15
		0,075	7,95	1877,26
		0,038	4,59	1084,67
$[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2)	V_{max} ($\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$)	K_m (M)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
	$2,99 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-4}$	1,49	13504,84
		Pirogalol	TON	TOF (h^{-1})
		0,50	2,50	150,00
		0,25	2,07	124,43
		0,15	1,71	102,87
		0,075	1,18	70,75
		0,038	0,70	42,11

TON: Número de recambio (número de moles de producto/número de moles de catalizador).

TOF: Frecuencia de recambio (h^{-1} , moles de sustrato convertidos por mol de catalizador por hora). Valores calculados a los 10 min del comienzo de la reacción

Para poder evaluar la eficiencia catalítica de los complejos sintetizados, se comparan los valores de la constante de afinidad por el sustrato K_m y la relación k_{cat}/K_m .

Como mencionáramos, es sabido que K_m es la constante de disociación del sustrato del complejo catalizador-sustrato y que k_{cat}/K_m se utiliza con frecuencia para comparar la actividad catalítica de diferentes compuestos.

De los resultados obtenidos, es destacable el complejo(1) que presenta un eficiencia catalítica k_{cat}/K_m al menos veinte veces mayor que el complejo(2) con

los valores más altos de TON y TOF para el mismo tiempo de reacción e incluso con la concentración más baja. Entonces, se puede proponer que el complejo(1) demuestra mayor selectividad en la oxidación del pirogalol, siendo más eficiente que complejo(2).

Buscando una explicación para este comportamiento, encontramos trabajos previos en los que utilizan sustratos similares (por ejemplo, catecol o 3,5-di-ter-butil catecol). Basados en los mismos, una posible explicación podría ser que el cloro y el ligando con el puente disulfuro, que forman parte de la esfera de coordinación del metal generen una mayor estabilidad a la oxidación degradativa, como pudo observarse en otros compuestos con ligandos halogenados¹⁷⁹. Además, existen reportados compuestos con un alto perfil catalítico, que poseen ligandos con puentes disulfuro o con un único puente sulfuro donde se relaciona la efectividad catalítica a la presencia de disulfuro¹⁸⁰ en la estructura química de los mismos.

4.5. Actividad Antimicrobiana

Durante las últimas décadas se ha observado un aumento de las frecuencias de las infecciones debido a diferentes causas. El uso erróneo o innecesario de fármacos antimicrobianos potencia la aparición de cepas resistentes a los antibióticos de mayor uso. La aparición de diversos niveles de resistencias bacterianas generó una competencia entre los microorganismos.

Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia y estas consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana.

Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico, cuando el antibiótico es eficaz frente a ella, podemos esperar la curación de la infección; por el contrario es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección.

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) la resistencia a los agentes antimicrobianos compromete la prevención y el tratamiento eficaz de un número cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos ya que, en general, los pacientes que contraen infecciones causadas por microorganismos farmacorresistentes tienen peor pronóstico y un mayor riesgo mortal que los individuos infectados con bacterias de la misma especie que no presenten esas resistencias. Se ha detectado resistencia en el tratamiento de enfermedades tales como las causadas por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), bacilo de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*),

¹⁷⁹ E.C.M Ording-Wenker, M.A Siegler, M. Lutz, E. Bouwman. *Dalton Trans.* **2015.** 44, 12196-12209.

¹⁸⁰ K.A.D F Castro, F. Figueira, R.F Mendes, J.A.S Cavaleiro, M. da Graça, P.M.S Neves, M.M.Q Simões, F.A Almeida Paz, J.P.C Tomé, S. Nakagaki. *Chem Cat Chem.* **2017.** 9, 2939-2945.

Plasmodium falciparum (agente causal de malaria), *Staphylococcus aureus* (infecciones nosocomiales principalmente) y *Neisseria gonorrhoeae* entre otras.

En el informe de la OMS correspondiente a 2014 sobre la vigilancia mundial de la resistencia a los compuestos antimicrobianos se puso de manifiesto que, en el caso de los antibióticos, esta cuestión ha dejado de ser una posible preocupación futura para convertirse en un problema real que sin una acción urgente y coordinada nos dirige hacia una era post-antibióticos en la que infecciones corrientes y lesiones menores que se han venido tratando satisfactoriamente durante décadas pueden volver a resultar mortales.

4.5.1. Actividad antimicrobiana de drogas ISRS

Debido a la aparición de patógenos resistentes a múltiples fármacos, las terapias que se combinan con agentes antimicrobianos se han vuelto habituales^{181,182}. Una de las estrategias desarrolladas es la combinación de fármacos con antibióticos, ya que las interacciones sinérgicas pueden, eventualmente, prevenir la aparición de la resistencia adquirida, aumentar la eficacia, disminuir la toxicidad y proporcionar un espectro de actividad más amplio que los tratamientos con un solo antimicrobiano. Estudios previos han demostrado que la terapia antimicrobiana combinada es muchísimo más efectiva contra enfermedades difíciles de tratar como la tuberculosis y la infección por VIH, ya que estos microorganismos no responden a los tratamientos con un solo antibiótico porque son poco eficaces y generan resistencia¹⁸³.

Algunos fármacos, tales como los agentes antidepresivos sertralina, fluoxetina y paroxetina son conocidos por actuar como inhibidores de la bomba de eflujo en las células humanas. Muchos estudios reportan que las drogas de las familias de los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) poseen actividad antifúngica y antibacteriana (principalmente contra las bacterias grampositivas¹⁸⁴).

También el tratamiento combinado de sertralina con antibióticos aumenta de forma considerable el efecto antimicrobiano de los mismos, incluso en cepas de bacterias que son resistentes cuando se combinan ambos¹⁸⁵; así se ha reportado que algunas cepas previamente resistentes a los antibióticos se hicieron susceptibles con la adición de sertralina.

Por este motivo en este trabajo de investigación y basado en la actividad antimicrobiana demostrada por sertralina, resultó interesante para el caso de los compuestos derivados de este fármaco, la determinación del perfil antimicrobiano y los resultados del ensayo se presentan en esta sección.

¹⁸¹ E. Jawetz. *Ann Rev Pharmacol*. **1968**. 8, 151-170.

¹⁸² C. Walsh. *Nature*. **2000**. 406, 775-781.

¹⁸³ C.R.J Horsburgh, S. Feldman, R. Ridzon. *Clin Infect Dis*. **2000**. 31, 633-639.

¹⁸⁴ J.L Munoz-Bellido, S. Munoz-Criado, J.A García-Rodríguez. *Int J Antimicrob Agents*. **2000**. 14, 177-180.

¹⁸⁵ M. Ayaz, F. Subhan, J. Ahmed, A. Khan, F. Ullah, I. Ullah, G. Ali, N.Husain Syed, S. Hussain. *J Biol Res Thessaloniki*. **2015**. 22(4), 1-8.

4.5.1.1. Actividad antimicrobiana del Cu(II)

Por las razones mencionadas previamente hay una búsqueda permanente de nuevos compuestos más eficaces y más seguros para la lucha antimicrobiana. Esto ha creado la necesidad de sintetizar nuevos fármacos. Se sabe que algunos complejos metálicos exhiben propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas y que las eficacias de los agentes terapéuticos se incrementan por coordinación¹⁸⁶. En la literatura, existen numerosas series de complejos de Cu, Zn, Ag, Co, entre otros, con propiedades antimicrobianas mayores que la de los ligandos libres, lo que ha resultado un campo atractivo de investigación^{187,188,189,190}. Varios complejos de cobre han sido efectivos como agentes antibacterianos independientemente de la disposición geométrica. Así por ejemplo, se reportaron: un monómero octaédrico (Cu(II)N₆), dímeros pentacoordinados (Cu(II)O₄N, Cu(II)N₂O₃) y complejos de geometría cuadrado plana (Cu(II)N₂O₂) entre otros como compuestos antibacterianos.

No está completamente dilucidado cuál es el mecanismo que explique por qué el cobre puede actuar como un agente antibacteriano. Su acción más probable está relacionada a su capacidad redox (Cu(II)/Cu(I)). Algunos estudios sugieren que en concentraciones elevadas, tiene un efecto tóxico sobre las bacterias debido a la liberación de radicales de hidropéroxido. En relación al efecto tóxico pueden ocurrir muchos procesos; por una parte los iones de cobre podrían potencialmente reemplazar iones esenciales como el hierro (necesario para el metabolismo bacteriano) interfiriendo inicialmente con la función de la membrana celular y luego a nivel del citoplasma alterando la síntesis proteica, ya sea inhibiendo la formación de proteínas o provocando la síntesis de proteínas disfuncionales, alterando la actividad de enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano¹⁹¹. También se ha sugerido que la toxicidad *in vivo* del Cu(II) en los microorganismos puede estar relacionada con el daño oxidativo en el ADN debido a su capacidad de catalizar reacciones (reacciones Fenton y Haber Weiss), produciendo intermediarios de oxígeno altamente reactivos^{192,193}.

En este contexto, se planteó la determinación del perfil antimicrobiano del complejo en estudio.

4.5.2. Actividad antimicrobiana de (SerH₂)₂[CuCl₄]

¹⁸⁶ S. Selvaraj, S. Krishnaswamy, V. Devashya, S. Sethuraman, U.M Krishnan. *Med Res Rev.* **2014.** 34, 677-702.

¹⁸⁷ Z.H Chohan, S.H Sumrra, M.H Youssoufi, T.B Hadda. *Eur J Med Chem.* **2010.** 45(7), 2739-2747.

¹⁸⁸ N.E.A El-Gamel, M. Zayed. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* **2011.** 82, 414-423.

¹⁸⁹ J.J Joseph, K. Nagashri, G.B Janaki. *Eur J Med Chem.* **2012.** 49, 151-163.

¹⁹⁰ J.A Zhang, M. Pan, J. Jiang, Z. She, Z. Fan, C. Su. *Inorg Chim Acta.* **2011.** 374, 269-277.

¹⁹¹ L. Rodríguez-Montelongo, L. De la Cruz-Rodríguez, R.N Fariás, E.M Mass. *Biochim Biophys Acta.* **1993.** 1144, 77-84.

¹⁹² C. Espírito Santo, E.W Lam, C.G Elowsky, D. Quaranta, D.W Domaille, C.J Chang, G. Grass. *Appl Environ Microbiol.* **2011.** 77, 794-802.

¹⁹³ M. Ibrahim, F. Wang, M. Lou, G. Xie, B. Lli, Z. Bo, G. Zhang, H. Liu, A. Wareth. *J Biosci Bioeng.* **2011.** 112, 570-576.

Teniendo en cuenta la importancia farmacológica que tienen los complejos de coordinación de Cu(II) y los compuestos heterocíclicos de nitrógeno como agentes antimicrobianos¹⁹⁴, y considerando que se han reportado bacterias como la *P.aeruginosa*, *E.coli* y *S.Aureus* que desarrollan agranulocitosis (una extraña complicación padecida por el uso de drogas antitiroideas), se busca ver cuál es el efecto del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ en cepas de bacterias y hongos.

Para ello se estudió la capacidad del complejo de inhibir el crecimiento mediante el ensayo de CIM, concentración inhibitoria mínima (que es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo luego de su incubación). Los valores de CIM de los compuestos en estudio se determinaron mediante el método de dilución en agar y se compararon con el efecto del ligando y del metal libre en busca de una probable potenciación, de acuerdo a lo descrito en la parte experimental.

Se sabe que la actividad antibacteriana se considera significativa cuando los valores de CIM son del orden de 100 µg/mL o menores a éste. Cuando la CIM está en el rango entre 100 a 500 µg/mL, la actividad antibacteriana se considera moderada, cuando está entre 500 a 1000 µg/mL se considera que no tiene actividad el compuesto testado.

Los resultados encontrados se muestran en la Tabla 8. Como puede verse, el complejo presenta una fuerte actividad frente a las cepas testadas a excepción de *P. Aeruginosa*. Sin embargo, si se compara con sertralina no existen diferencias significativas respecto de la actividad demostrada por el fármaco solo. Para el caso de las cepas testadas con la sal $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ los valores de CIM fueron 375 µg/mL para las cepas bacterianas manifestando una moderada actividad frente a estos y por otro lado frente a las cepas fúngica fue mayor, de 1.500 µg/mL considerado irrelevante desde el punto de vista clínico. Este comportamiento es conocido y ha sido previamente reportado¹⁹⁵.

Por lo tanto, podemos concluir que las propiedades antibacterianas demostradas se deben a la existencia de la sertralina en el complejo y no se observa un efecto sinérgico aportado por la presencia de cobre. Sin embargo es importante destacar que frente a una probable administración del complejo este no afectará la actividad antimicrobiana que posee la sertralina.

Cabe mencionar que la actividad antimicrobiana sólo fue determinada para este compuesto debido al interés en comparar si existía o no potenciación de la actividad demostrada por sertralina.

¹⁹⁴ H. Liu, W. Yang, W. Zhou, Y. Xu, J. Xie, M. Li. *Inorg Chim Acta*. **2013**. 405, 387-394.

¹⁹⁵ J.C.A Tanaka, C.C Silva, A.J.B Oliveira, C.V Nakamura, B.P Dias Filho. *Braz J Med Biol Res*. **2006**. 39, 387-391.

Tabla 8. Concentración inhibitoria mínima (CIM) para SerH₂Cl (sertralina), CuCl₂.2H₂O y (SerH₂)₂[CuCl₄] sobre cepas bacterianas y fúngicas. Los valores de CIM se expresan en µg/mL.

	SerH ₂ Cl	CuCl ₂ .2H ₂ O	(SerH ₂) ₂ [CuCl ₄]
<i>E. coli</i>	24	375	48
<i>P. aeruginosa</i>	750	375	1500
<i>E. faecalis</i>	24	375	24
<i>S. aureus</i>	24	375	48
<i>S. epidermidis</i>	24	375	24
<i>C. albicans</i>	6	>1500	12
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	12	>1500	12
<i>C. parapsilosis</i>	12	>1500	6
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	6	>1500	6
<i>C. krusei</i>	3	1500	6
<i>C. glabrata</i>	3	1500	6
<i>C. tropicalis</i>	6	>1500	6

4.6. Conclusiones

En este capítulo se mostraron las actividades biológicas determinadas *in vitro* para nuestros compuestos en estudio.

En relación a las determinaciones de actividades antitiroideas, se contaba con la información previa de sertralina, respecto de que era capaz de formar complejos de TC con el yodo, con un valor de $K_c = 3277,48 \text{ M}^{-1}$ el cual refiere a actividad antitiroidea. De la misma forma se estudió el complejo (SerH₂)₂[CuCl₄] el cual en este caso dio lugar a la desaparición de la banda del yodo sin formar complejo de TC y en esas instancias de las investigaciones no pudimos atribuir dicho comportamiento a algo concreto. Cuando se realizaron los experimentos de inhibición enzimática, se observó que el clorhidrato de sertralina era capaz de inhibir la LPO (IC₅₀ = 80 µM) mientras que el complejo no pudo inhibir a la misma.

Para el sistema de Mg(II) con el ácido DL-piroglutámico, no se observó capacidad de interaccionar mediante TC para el ligando pero sin embargo el complejo, Mg(DL-pGlu)₂, fue capaz de formar un complejo de TC de relación 1:1 con un valor de constante de $K_c = 45366,5 \text{ M}^{-1}$ siendo, comparativamente de mayor eficiencia que sertralina.

Finalmente los experimentos realizados con DMA y MgDMA dieron cuenta que DMA pudo formar un complejo de TC de relación 1:1 DMA:I₂ con un valor de $K_c = 12479 \text{ M}^{-1}$ mientras que la interacción del yodo con el complejo dio lugar a la

formación de un complejo de TC de relación 1:2 que pudo demostrarse por el método de la razón molar junto con la formación de la especie I_3^- . Ninguno de los complejos de Mg(II) fue capaz de inhibir la LPO.

Como remarcáramos anteriormente, la determinación de actividades antioxidantes resulta atractiva desde la perspectiva centrada en que el estrés oxidativo se produce en diversas enfermedades y que, adquiere relevancia el hecho de que un compuesto en estudio pueda tener multifuncionalidades. En particular y dados los antecedentes previos reconocidos para complejos de Cu(II), se determinó la capacidad de los mismos de simular la enzima superóxido dismutasa. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9. Resumen de la parámetros de actividad SOD para complejos derivados de Cu(II)

Complejo	Geometría	IC ₅₀ [M]	$k_{McCF}[mol^{-1}Ls^{-1}]$
[Cu(C ₄ H ₅ N ₂ S) ₂ Cl ₂ ·2H ₂ O] (1)	Planar	135 x 10 ⁻⁶	1,32 x 10 ⁵
[Cu(C ₈ H ₁₀ N ₄ S)SO ₄ ·H ₂ O](2)	Piramidal	1,2 x 10 ⁻⁶	1,49 x 10 ⁷
(SerH ₂) ₂ [CuCl ₄]	Tetraédrico	6,6 x 10 ⁻⁶	2,83 x 10 ⁶

La observación de los datos obtenidos nos permite inferir la relevancia de la distorsión estructural en la mayor eficiencia de los complejos como SOD símil.

También se midieron para los complejos de cobre la actividad en relación al radical DPPH• y en este caso la mejor actividad obtenida fue para el complejo cuadrado plano mientras que, ni el piramidal ni el tetraédrico, fueron capaces de inhibir al DPPH• y, donde una posible explicación a la actividad demostrada es la presencia del puente disulfuro como base de su estructura. Para los complejos de Mg(II) no se realizaron este tipo de determinaciones.

Intentamos también en este capítulo hablar de la relevancia (desde el punto de vista del desarrollo de nuevos potenciales fármacos) a la inhibición de la actividad enzimática de las fosfatasa, tanto ácida como alcalina, así como la posibilidad de simular la actividad que ejercen las mismas. De los complejos de cobre testeados, el complejo derivado de sertralina presentó problemas de solubilidad en el medio en que se realizan los ensayos y por ende para el mismo no se pudieron obtener resultados reproducibles ni para FAL ni FAc. Para los complejos derivados del metimidazol, los resultados mostraron que no fueron capaces de inhibir la FAL pero sí demostraron actividad inhibitoria frente a la FAc, en especial el complejo de geometría planar cuyo valor de IC₅₀ fue de 0,58 μM. Así como para los complejos de cobre se buscó determinar la capacidad inhibitoria que tienen los mismos sobre las fosfatasa, para los complejos de magnesio se buscó demostrar si eran capaces de simular la actividad enzimática, dado que, como explicamos, existen evidencias previas que sugieren que la presencia de Mg(II) favorece la actividad especialmente de

la FAL. De las mediadas realizados, observamos que el complejo $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ no mostró capacidad de estimular la actividad de FAL pero por el contrario, el complejo MgDMA fue capaz de incrementar la V_{max} enzimática y mostrar un incremento en la selectividad y en el % de formación del PNP en comparación con la FAL y con la FAL en presencia de MgCl_2 .

Otras de las cuestiones que abordamos fue el estudio de actividad símil peroxidasas. Estos estudios, resultaron tener correlación directa con las determinaciones de actividades antitiroideas dado que otro de los posibles mecanismos de acción de este tipo de drogas es la capacidad de impedir que el agua oxigenada endógena oxide el sitio activo de la TPO para así impedir la formación de mayor cantidad de T3 y T4. Por otra parte, es en sí una actividad antioxidante. Estas medidas se realizaron para los compuestos de cobre. Cuando iniciamos, que fue el caso del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$, sólo se utilizó el método del rojo fenol, se observó la actividad catalítica y se pudo determinar una constante de velocidad de pseudo primer orden k ($0,157 \pm 0,007 \text{ min}^{-1}$) y el tiempo de vida media $t_{1/2} = 4,41 \text{ min}$, demostrando la efectividad de este complejo. Pero, en los trabajos posteriores con los complejos de cobre derivados de metimidazol, se realizaron una serie de estudios cinéticos de mayor complejidad y se utilizaron dos modelos, el del rojo fenol y la oxidación del pirogalol.

En términos generales, ambos complejos mostraron actividad similar a la peroxidasa. El complejo (2) ($k_{\text{cat}}/K_m = 5,48 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 6,45 \text{ min}^{-1}$) se comportó como un mejor catalizador rojo fenol que el complejo (1) ($k_{\text{cat}}/K_m = 104,5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 0,14 \text{ min}^{-1}$). En oposición, complejo (1) reveló una mayor selectividad en la oxidación de pirogalol ($k_{\text{cat}}/K_m = 308153,02 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 45,66 \text{ min}^{-1}$). Claramente se presentan diferencias en la afinidad por el sustrato.

Si, nos referimos nuevamente a la actividad antitiroidea y las posibles vías de inactivación de la formación de DIT y MIT podemos resumir las experiencias realizadas en el siguiente cuadro (para referencia revisar la Figura 4):

Tabla 10. Resumen de los distintos mecanismos de actividad antitiroidea para los complejos derivados de $\text{Mg}(\text{II})$ y $\text{Cu}(\text{II})$.

Compuestos en estudio	Captura de yodo	Símil peroxidasa	Inhibición de LPO
$(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$	No demostrada	Posee actividad	No inhibe
Clorhidrato de sertralina	Captura el yodo (demostrada anteriormente)	No posee	Inhibe
$[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	No demostrada	Posee actividad	No determinada
$[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}]$	No demostrada	Posee actividad	No determinada
$\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$	Demuestra interacción	No determinada	No inhibe
DLpGlu	No se detecta	No determinada	No inhibe
MgDMA	Demuestra interacción	No determinada	No inhibe
DMA	Demuestra interacción	No determinada	No inhibe

Podemos entonces concluir que a lo largo de esta tesis pudimos demostrar inhibición sobre los tres mecanismos propuestos para la determinación de actividad antitiroidea.

Finalmente y, sólo para el complejo derivado de sertralina, se determinó la actividad antibacteriana cuyos resultados fueron comparables a los obtenidos para sertralina sola y nos permite asumir que no se observa un efecto sinérgico relevante aportado por la presencia de cobre.

CAPÍTULO 5

Biodisponibilidad: interacción de
ligandos y compuestos de
coordinación con albúmina sérica
bovina.

Capítulo 5. Biodisponibilidad: interacción de ligandos y compuestos de coordinación con albúmina sérica bovina.

Las proteínas transportadoras son aquellas que proporcionan un medio de transporte, bien en el plasma o a través de la membrana celular, a aquellos sustratos que interaccionan en el centro activo de ésta. Como ejemplos de proteínas transportadoras se pueden citar las lipoproteínas, que son las encargadas de transportar las grasas por todo el organismo, las albúminas séricas, que son proteínas plasmáticas que actúan como vehículo de diversos agentes, tanto endógenos (ácidos grasos, hormonas, enzimas) como exógenos (fármacos) y la α -glicoproteína ácida, que es otra proteína plasmática que, entre otras funciones, se encarga del transporte de fármacos básicos o neutros por el organismo.

Las albúminas séricas se caracterizan por ser proteínas muy flexibles porque pueden adaptar su estructura para interaccionar con una gran variedad de sustratos en sus distintos sitios de unión. Por esta misma razón es sumamente importante estudiar la capacidad que posee un nuevo compuesto de poder unirse a esta proteína ya que la efectividad que posea éste, lo convertirá en un compuesto con gran potencial farmacológico. Por lo tanto el análisis de la interacción fármaco/albúminas séricas es importante para conocer la biodistribución, el metabolismo, la eliminación y el efecto farmacológico de estos en el organismo.

Esta proteína se encuentra presente en todas las especies animales. Puede ser extraída de bovinos (ASB), ratas (ASR), conejos (ASC), cerdos (ASCe), perros (ASP), humanos (ASH), etc. Muchas de estas albúminas se han usado para estudios de interacción con fármacos y de farmacocinética en lugar de ASH, basándose en la alta similitud encontrada en las secuencias de aminoácidos de otras especies respecto a la humana.

La albúmina sérica humana (ASH) es la principal proteína extracelular y es la que se encuentra en mayor proporción en la sangre (60% del total de las proteínas plasmáticas). Ésta actúa como un verdadero depósito de drogas en el organismo, y además las protege de ser modificadas por el metabolismo. Habitualmente la albúmina sérica aumenta la solubilidad de drogas hidrofóbicas en el plasma y modula la circulación, el metabolismo y la eficacia de muchas drogas *in vivo* e *in vitro*^{1,2,3}.

La albúmina sérica que se usa comúnmente en el laboratorio es la albúmina sérica bovina (ASB) por su homología estructural cercana con la ASH. La ASB es adecuada como proteína modelo para la liberación de fármacos debido a su importancia médica, abundancia, bajo costo, facilidad de purificación,

¹ U. Kragh-Hansen, V.T.G Chuang, M. Otagiri. *Biol Pharm Bull.* **2002.** 25, 695-704.

² Y.J Hu, Y. Liu; R.M Zhao, J.X Dong, S.S Qu. *J Photochem Photobiol A Chem.* **2006.** 179, 324-329.

³ E.G Ferrer, A. Bosch, O. Yantorno, E.J Baran. *Bioorg Med Chem.* **2008.** 16, 3878-3886.

propiedades inusuales de unión al ligando y que es ampliamente aceptada en la industria farmacéutica^{4,5,6}.

Importancia de estudiar la biodisponibilidad de los complejos

Uno de los aspectos más interesantes cuando se intenta preparar complejos con potenciales aplicaciones biológicas-farmacológicas, es intentar averiguar si los mismos son susceptibles a ser transportados por la albúmina, ya que esa factibilidad aumenta enormemente las posibilidades de que estos compuestos sean biodisponibles para su potencial utilización.

La espectroscopía de fluorescencia permite conocer los mecanismos de enlace de la albúmina con diferentes compuestos y además, puede proporcionar información relacionada a la naturaleza del enlace. Las mediciones de fluorescencia brindan información acerca del entorno molecular en las cercanías de las moléculas del cromóforo, ya que la intensidad de fluorescencia de un compuesto puede disminuir por una variedad de interacciones moleculares.

Independientemente de la vía de administración de los fármacos, (oral, subcutánea, intramuscular, etc) estas son transportadas por la sangre de esa manera y así pueden encontrarse con distintos componentes celulares y proteínas transportadoras plasmáticas. La albúmina es una de las proteínas más abundantes que transportan fármacos. El mecanismo por el cual se asocia el potencial agente farmacológico a la ASB es de gran interés. Generalmente, la constante de asociación aparente para la interacción droga-proteína es $\leq 10^6$ M, el cual lo que permite que exista un rápido equilibrio farmacocinético-farmacodinámico⁷. En solución la ASB posee una conformación específica pero posee varias partes flexibles. La proteína puede abrir o cerrar algunas áreas de su estructura, y exponiéndolas o escondiendo residuos de aminoácidos, siendo este el modo con que la ASB interactúa con las drogas. Los diferentes tipos de interacción pueden ser: mediante la formación de puentes de hidrógeno, mediante fuerzas de Van de Waals, o por interacciones hidrofóbicas o iónicas¹¹.

Este tipo de interacciones poseen gran influencia en la estabilidad y toxicidad de las drogas y puede ser relevante al momento de su distribución y eficacia como agente farmacológico. De esta manera el estudio de la potencialidad de asociación del poder asociarse al potencial agente terapéutico, es una primera etapa relevante para poder comprender de mejor manera su eficacia como biotransportador.

⁴ S. Bi, L. Yan, B. Pang, Y. Wang. *J Lumin* .**2012**. 132, 132-140.

⁵ L. Tang, W. Jia, Zhang. *Luminescence*. **2014**. 29, 344-351.

⁶ X. Zhao, Y. Liu, L. Niu, C. Zhao. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. **2012**. 94, 357-364.

⁷ F. Kratz, B.T Elsadek. *J Control Release*. **2012**. 161, 429-445.

Existe muchísima evidencia experimental sobre la interacción entre la albúmina y distintas biomoléculas y estos estudios aportaron una mayor información de cómo se establece el tipo de unión entre ambos.

Se sabe que cuando la unión se da a uno o pocos sitios de mayor afinidad de la albúmina, esto va acompañado con valores de constantes de asociación K_a que se encuentran entre 10^4 y 10^6 M^{-1} , sugiriendo que la seroalbúmina se comporta como un transportador⁸. Pero además, la seroalbúmina posee sitios de baja afinidad; por lo tanto cuando se obtienen valores de constante K_a , con un orden de magnitud alrededor de 10^3 M^{-1} la unión que existe entre la molécula y el transportador es del tipo reversible⁹.

Se postula que aquellos compuestos que posean valores de K_a como los mencionados previamente, se considera que deberían poseer una buena biodisponibilidad, lo que favorecería su solubilidad y modularía su distribución a nivel celular tanto *in vivo* como *in vitro*. Por todo lo descripto, estos estudios, *a priori* de los posteriores farmacocinéticos, son una muy buena herramienta desde el punto de vista farmacológico¹⁰.

Las técnicas utilizadas comúnmente para detectar la interacción entre el fármaco y la albúmina sérica incluyen espectroscopía de fluorescencia, espectrofotometría UV, espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía Raman, resonancia magnética nuclear y electroquímica^{11,12}. En esta tesis se emplearon las técnicas de fluorescencia, espectroscopía UV-Vis así como espectroscopía de resonancia paramagnética (ERP) (en este último caso para la exploración del entorno de Cu(II) luego de la interacción con ASB).

5.1. Experimentos de fluorescencia intrínseca de la albúmina sérica bovina (ASB), espectroscopía UV-Vis y resonancia paramagnética electrónica (EPR).

5.1.1. Interacción de derivado de sertralina, $(SerH_2)_2[CuCl_4]$ con ASB

Cabe mencionar que tanto para Cu(II) libre y sertralina se encuentran datos precedentes en el grupo de trabajo y por ese motivo no se exponen en esta sección.

Para el complejo $(SerH_2)_2[CuCl_4]$ se observó que a las dos temperaturas ensayadas, 298 K y 310 K (25 °C y 37 °C respectivamente), se produce una desactivación de la intensidad de la fluorescencia de la albúmina para todo el rango de concentraciones ensayadas. Este comportamiento es indicador de que hay una pérdida de la intensidad de la fluorescencia por cambios ocasionados en el entorno de los residuos aminoácidos fluoróforos de la

⁸ N. Cacita, S. Nikolaou. *J Lumin.* **2016** .69, 115-120.

⁹ Y. Zhang, S. Shi, X. Sun, X. Xiong, M. Peng. *J Inorg Biochem.* **2011**. 105, 1529-1537.

¹⁰ J. Lin, Y. Liu, M. Chen, H. Huang. *J Lumin.* **2014**. 15, 39-46.

¹¹ Y. Shang, H. Li. *Russ J Gen Chem.* **2010**. 80, 1710-1717.

¹² L. Tang, W. Jia, D. Zhang. *Luminescence.* **2014**. 29, 344-351.

albúmina producidos por la interacción favorable entre el complejo y la proteína en estudio. En la Figura 1 se puede ver a modo de ejemplo el proceso de desactivación o “*quenching*” de la fluorescencia intrínseca de la ABS para el sistema ASB-(SerH₂)₂[CuCl₄] obtenido a 25°C.

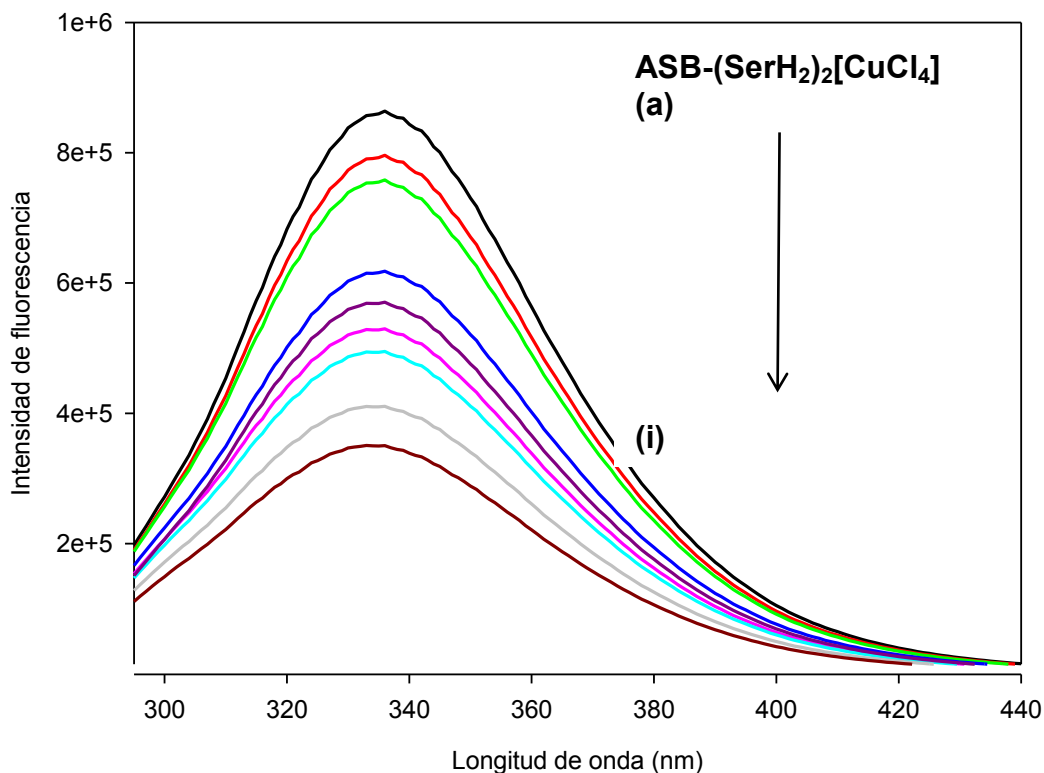


Figura 1. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB-(SerH₂)₂[CuCl₄]. La concentración de ASB para todos los ensayos fue de 6 µM, y la concentración de (SerH₂)₂[CuCl₄]: (a) 0; (b) 2; (c) 10; (d) 20; (e) 30; (f) 40; (g) 50; (h) 75; y (i) 100 µM. (25 °C; pH = 7,4; λ_{exc} = 280 nm, λ_{em} = 336 nm)

Los resultados obtenidos para las determinaciones experimentales de la interacción con albúmina por medio de la técnica de fluorescencia que fueron realizados tanto a 25 °C como a 37 °C se muestran en la Figura 2, donde se observan las representaciones gráficas de las curvas de Stern-Volmer (F⁰/F vs [Q]).

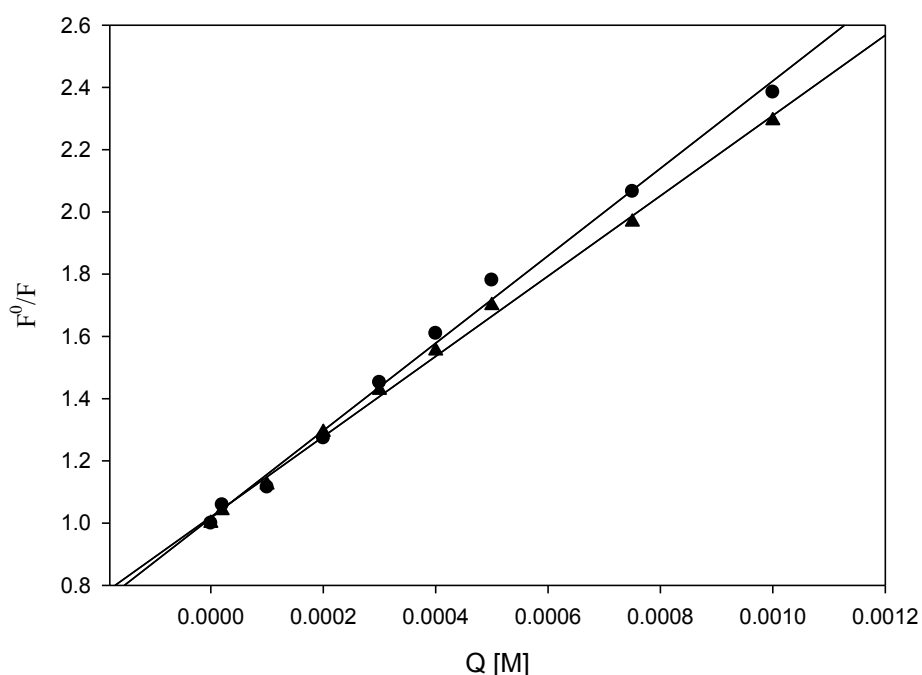


Figura 2. Gráfica de Stern-Volmer para el sistema $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ -ABS a (●) 298K (25 °C) y (▲) 310K (37 °C). $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. $[\text{ASB}] = 6 \text{ }\mu\text{M}$, $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] = 0\text{-}100 \text{ }\mu\text{M}$.

Puede verse en la representación (Figura 2) que existe una correlación lineal en el rango de concentraciones medidos entre 0-100 μM . Dado este resultado se infiere que podría establecerse un carácter de “*quenching*” simple (estático o dinámico) en este rango de concentraciones.

Los valores experimentales obtenidos para la constante de Stern-Volmer K_{SV} son: $1,4 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ a 25 °C y $1,29 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}$ a 37 °C, siendo los valores correspondientes de K_q $1,4 \times 10^{11} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $1,29 \times 10^{11} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Las constantes de “*quenching*” bimolecular K_q obtenidas resultaron mayores a la constante de velocidad del *quenching* por difusión colisional ($2 \times 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}\text{s}^{-1}$, valor de referencia). Esta comparación permite deducir que la interacción no se genera a través de una colisión dinámica pero sí a través de la formación de un complejo con la ASB.

De esta manera, a continuación, este tipo de interacción que hemos descrito puede interpretarse mediante el cálculo de las constantes de unión (K_a) y el número de sitios de unión n a partir de las gráficas de $\log F^0/(F^0-F)$ vs $\log [Q]$ (Figura 3 y Tabla 1).

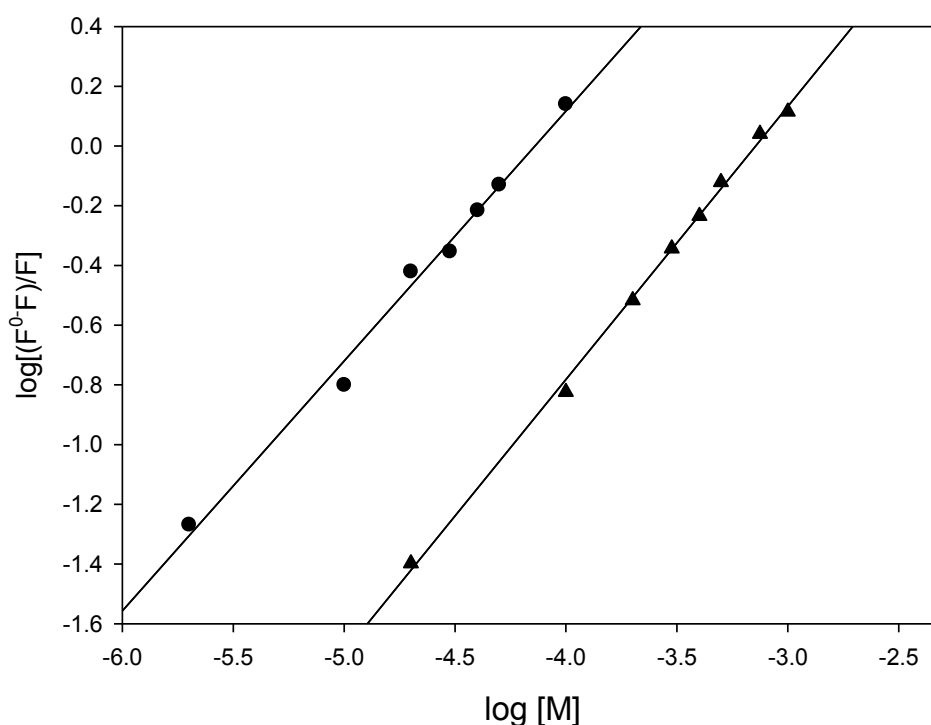


Figura 3. Gráfica de $\log(F^0-F)/F$ vs $\log[M]$ para el sistema $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ -ASB para (●) 298K (25 °C) y (▲) 310K (37 °C). λ_{exc} : 280nm. [ASB]: 6 μM , $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$: 0-100 μM .

Puede destacarse que los valores de constante de unión ($\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$) para el compuesto están en el rango esperado para los antidepresivos que se unen a la ASB¹³ (incluida la sertralina con un $K_a = 40,7 \text{ M}^{-1}$).

Tabla 1. Constante de unión aparente K_a , “ n ” sitios de unión y parámetros termodinámicos para el sistema de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.

pH	T(K)	$K_a (\text{M}^{-1}) \pm \text{D.S}$	$n \pm \text{D.S}$	$^a r^2$	ΔH^0 (KJ/mol)	ΔG^0 (KJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)
7,4	298	$2,90 \times 10^3 \pm 0,07$	$0,84 \pm 0,04$	0,98	-87	-19,75	-225,7
	310	$7,47 \times 10^2 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,03$	0,99			

^a r^2 : coeficiente de correlación para los valores de K_{SV} .
DS: desviación estándar

Se sabe que la sertralina es capaz de unirse en un 98% a la ASB y que su máxima concentración se encuentra en un tiempo medio estimado entre 6-8 horas para lograr una efectiva interacción. Por el contrario, se observa que el tiempo de interacción se acorta muchísimo con el derivado de cobre-sertralina (2 hrs), siendo así la unión a ASB mucho más fuerte que el de la sertralina sola

¹³ G.E Escudero, C.H Laino, G.A Echeverría, O.E Piro, N. Martini, A.N Rodríguez, J.J Martínez Medina, L.L López Tévez, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *Chem Biol Interact.* **2016.** 249, 46-55.

(obteniéndose en iguales condiciones de interacción a 310 K los valores K_a $40,7 \text{ M}^{-1}$; con $n = 0,45$)¹⁰.

Por lo tanto esto nos sugiere que hay una mejora sustancial en la capacidad de unirse a la albúmina¹⁰. Por otro lado que el valor del sitio de unión n sea aproximadamente 1 significa que hay un solo de sitio de unión disponible de la albúmina para la unión con el compuesto.

En una serie de estudios sistemáticos previos realizados por Ross y colaboradores¹⁴ sobre una gran variedad de compuestos, se propone que el signo de los parámetros termodinámicos expone la naturaleza del tipo de interacción que tiene lugar durante la formación del complejo entre el compuesto estudiado y la albúmina.

Los parámetros termodinámicos son calculados usando la ecuación de Van't Hoff^{15,16} y estos resultados son incluidos en la Tabla 1.

De acuerdo a los valores calculados, el valor de ΔG^0 refleja la posibilidad de que ocurra la reacción de manera espontánea, mientras que los de ΔH^0 y ΔS^0 sugieren cuáles son el tipo de fuerzas que estarían actuando.

En general la naturaleza de este tipo de interacciones pueden ser electroestáticas, por puentes de hidrógeno, por fuerzas de van der Waals y por interacciones del tipo hidrofóbicas^{17,18}. Estas últimas juegan un papel importantísimo en la unión de los ligandos a las proteínas. Para nuestros resultados, los cambios de entalpía y entropía negativos sugieren que las interacciones involucradas son del tipo de fuerzas de van der Waals y la formación de enlaces de puente hidrógeno en un medio dieléctrico bajo y con asociaciones acompañadas de protonación. En este caso es fácil pensar que la unión del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ tiene lugar principalmente mediante fuerzas de van der Waals.

Para respaldar estos resultados se estudió además la interacción del complejo con la ASB mediante espectroscopía UV-Vis, Figura 4, ya que la misma constituye un método simple y apropiado para investigar cambios estructurales¹⁹. De los estudios realizados se observa que para la banda localizada en 280 nm, correspondiente a los residuos aromáticos de las cadenas laterales (fenilalanina, histidina, triptófano y tirosina) hay un aumento de la intensidad acompañado por un desplazamiento hacia la región azul del espectro, sugiriendo que existiría un cambio en la estructura de la albúmina con exposición de los residuos aromáticos (apertura). Esta variación en la longitud de onda máxima implica una alteración en la polaridad del entorno del residuo

¹⁴ P.D Ross, S. Subramanian. *Biochemistry*. **1981**. 20, 3096-3102.

¹⁵ N.M Urquiza, L.G Naso, S.G Manca, L. Lezama, T. Rojo, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *Polyhedron*. **2012**. 31, 530-538.

¹⁶ M. Shahlaei, B.A Rahimi, M.R Nowroozi, A. Kooshk. *Chem Biol Interact*. **2015**. 242, 235-246.

¹⁷ P.D Ross, S. Subramanian. *Biochemistry*. **1981**. 20, 3096-3102.

¹⁸ A. Naseri, S. Hosseini, F. Rasoulzadeh, M.R Rashidi, M. Zakery, T. Khayamian. *J Lumin*. **2015**. 157, 104-112.

¹⁹ B. Shuyun, S. Daqian, T. Yuan, Z. Xin, L. Zhongying, Z. Hanqi. *Spectrochim Acta Part A* **2005**. 61, 629-636.

de triptófano y un cambio en la cadena peptídica de la proteína y por consiguiente un cambio en la hidrofobicidad²⁰ conduciendo a un entorno más polar²¹. Además esto es un claro indicio de la formación de un complejo estable entre la albúmina y el complejo estudiado.

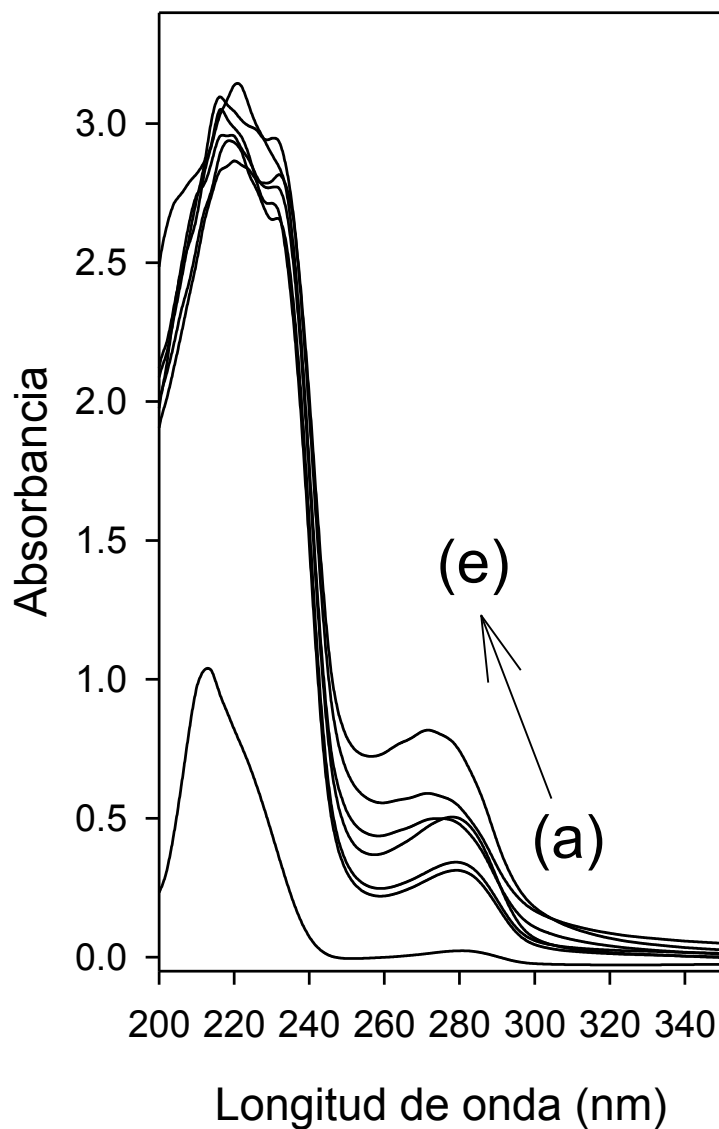


Figura 4. Espectro UV-Vis: región 200-375 nm. ASB (6 μM) y diferentes concentraciones de $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$: (a) 10 μM (b) 25 μM , (c) 50 μM , (d) 70 μM y (e) 100 μM .

Las determinaciones realizadas con la técnica de EPR no fueron de calidad suficiente para arrojar resultados experimentales que pudieran asignarse a la especie en solución.

²⁰ U. Kragh-Hansen. *Pharmacol Rev.* **1981**. 33, 17-53.

²¹ P.P Deschamps, P. Kulkarni, B. Sarkar. *Inorg Chem.* **2004**. 43, 3338-3340.

5.1.2. Biodisponibilidad: Interacción de complejos derivados de cobre y metimazol con ASB

Se procedió a analizar la interacción de los compuestos de cobre con la ASB mediante espectroscopía de fluorescencia (ver Figuras 5 y 6). Para ello, se ensayaron concentraciones crecientes de ambos complejos de cobre (0-150 μM) y se obtuvieron los espectros con la ASB. Los dos compuestos causan una desactivación (“*quenching*”) de la fluorescencia intrínseca de la albúmina sérica bovina la que depende de la concentración para las dos temperaturas ensayadas (a mayor concentración, mayor es el efecto observado). También se observa que no se producen cambios en el máximo de emisión, lo que indica que no hay variación en el entorno dieléctrico local.

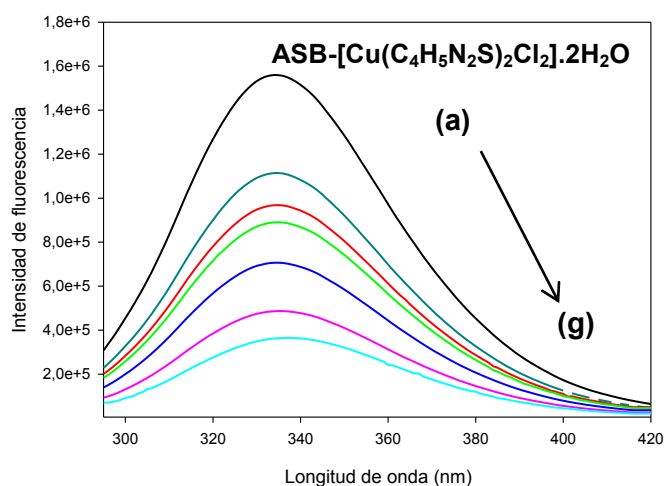


Figura 5. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB- $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1). La concentración de ASB para todos los ensayos fue de 6 μM , y la concentración de $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (a) 0; (b) 3,41; (c) 8,5; (d) 17; (e) 42,6; (f) 85,2 y (g) 117,8 μM . (25 °C; pH = 7,4; λ_{exc} = 280 nm, λ_{em} = 336 nm).

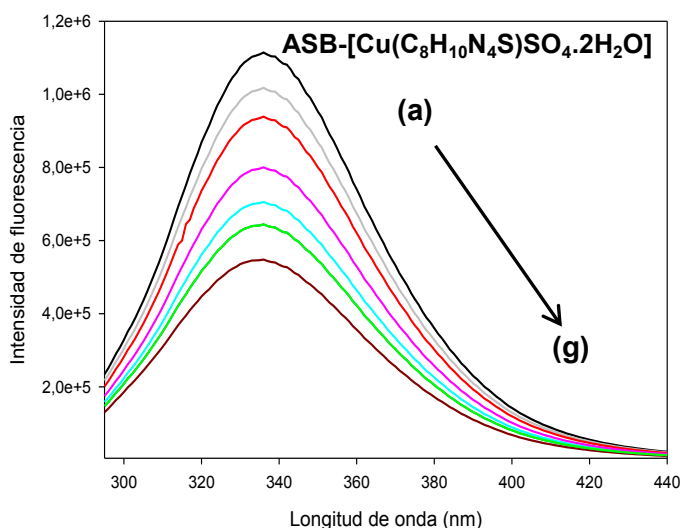


Figura 6. Espectros de fluorescencia para el sistema ASB- $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2). La concentración de ASB para todos los ensayos fue de 6 μM , y la concentración de $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: (a) 0; (b) 10; (c) 20; (d) 46; (e) 76; (f) 100 y (g) 150 μM . (37 °C; pH = 7,4; λ_{exc} = 280 nm, λ_{em} = 336 nm).

Los mecanismos de desactivación pueden ser estáticos o dinámicos. La manera de diferenciarlos es observando el comportamiento de la variación de la constante con la temperatura, es decir si la misma disminuye o se incrementa con la temperatura. Por otro lado si el gráfico es lineal es un indicio, de que el tipo de *quenching* es estático, pero en el caso de que la curva no sea lineal debe considerarse que hay un mecanismo de *quenching* combinado (estático o dinámico).

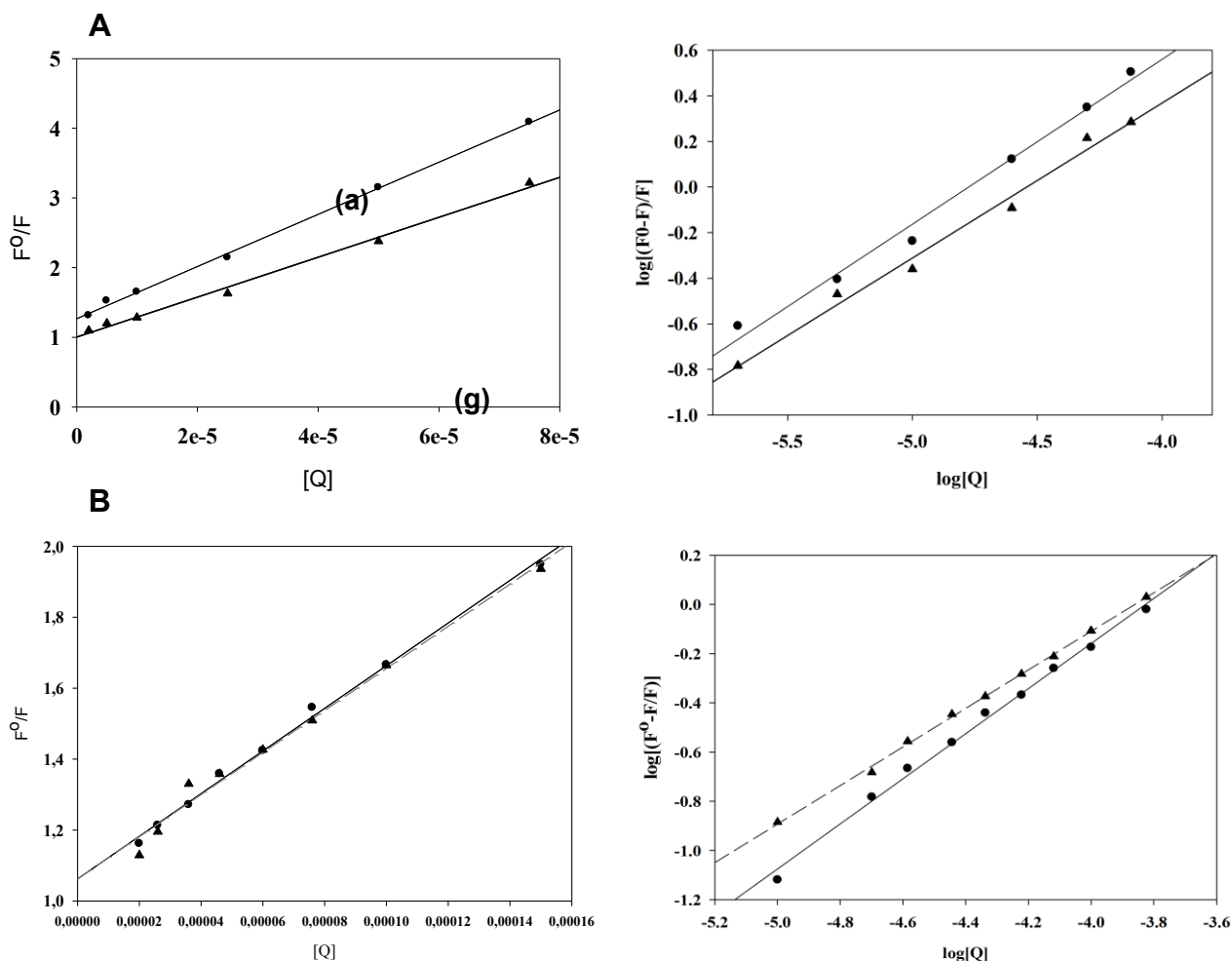


Figura 7. Derecha: Curvas de Stern-Volmer F^0/F vs $[Q]$ a (●) 298 K y (▲) 310 K; izquierda: curva de $\log[(F^0-F)/F]$ vs $\log[Q]$ para los sistemas de **(A)** $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)-ASB ($[\text{complejo}] = 0\text{-}117 \mu\text{M}$) y **(B)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2)-ASB ($[\text{complejo}] = 0\text{-}150 \mu\text{M}$). $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. $[\text{ASB}] = 6 \mu\text{M}$.

En la Figura 7 puede observarse que para ambos complejos de cobre la curva de Stern-Volmer es lineal. Además, las pendientes de los gráficos disminuyeron con el aumento de la temperatura, lo que sugiere que el *quenching* es estático. Los valores de las constantes K_{sv} para los dos complejos se muestran en la Tabla 2. Si un complejo es formado entre la ASB y los compuestos de cobre, la constante de velocidad de *quenching* K_q , puede estimarse usando la relación de constantes $K_q = K_{\text{sv}}/\tau_0$, donde τ_0 es el tiempo de vida media de la biomolécula sin el desactivador y, considerando que el tiempo de vida media de

fluorescencia de las biomoléculas sin el *quencher* es en promedio 10^{-8} s^{22} . Entonces este valor es comparado con el valor de referencia de K_q mencionado en la sección anterior de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y como resultó mucho más grande que este valor de referencia puede considerarse que el mecanismo de *quenching* es estático durante la interacción con la ASB. Los valores de K_q obtenidos para los dos complejos están en el orden de magnitud de $10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De esta manera puede proponerse que los complejos de cobre interactúan con la albúmina sérica bovina formando un complejo-ASB.

Tabla 2. Constante de unión aparente K_a , sitios de unión “n” y parámetros termodinámicos relativos del sistema a pH = 7: **(A)** $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1)-ASB y **(B)** $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2)-ASB.

T (K)	$K_{sv} (\text{M}^{-1}) \pm \text{S.D.}$	$K_a (\text{M}^{-1}) \pm \text{D.S.}$	$n \pm \text{D.S.}$	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)
(A)						
298	$3.74 \times 10^4 \pm 0,10$	$2,82 \times 10^3 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,03$	-124,58	-19,67	-352
310	$2.86 \times 10^4 \pm 0,11$	$1,23 \times 10^3 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,02$		-18,33	
(B)						
298	$6.19 \times 10^3 \pm 0,12$	$3,20 \times 10^3 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,02$	-167,23	-19,98	-494,1
310	$5.92 \times 10^3 \pm 0,19$	$1,05 \times 10^3 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,03$		-17,92	

DS: desviación estándar.

r^2 : coeficiente de correlación para los valores de K_{sv} y K_a en el rango 0,98-0,99.

La interacción entre la proteína y el ligando puede ser estimada obteniéndose el valor de la constante de asociación aparente (K_a) y el número de sitios de unión (n). La tabla 2 muestra los parámetros calculados. Puede verse que los valores de K_a rondan $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$. Como se conoce, este orden de magnitud de la constante K_a es indicativo de que la interacción se produce a través de sitios de afinidad más baja (para este caso cercano a uno, $n \sim 1$) con un comportamiento reversible con el transportador²³.

Además los tipos de interacciones que tienen lugar pueden estudiarse a partir de los parámetros termodinámicos. Con el objetivo de evidenciar el tipo de interacción que existe (enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, electrostática, hidrofóbica, etc) se analizó el signo de los parámetros termodinámicos para estimar la naturaleza de la interacción existente durante la formación del complejo entre la albúmina y los compuestos²⁴ Usando la ecuación de Van't Hoff, los parámetros calculados se muestran en la Tabla 2. Allí puede apreciarse que el signo negativo del ΔG^0 favorece la asociación,

²² B. Shuyun, S. Daqian, T. Yuan, Z. Xin, L. Zhongying. *Spectrochim Acta Part A*. **2005**. 61, 629-636.

²³ N. Martini, J.E Parente, M.E Toledo, G.E Escudero, C.H Laino, J.J Martínez Medina, G.A Echeverría, O.E Piro, L. Lezama, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *J Inorg Biochem*. **2017**. 174, 76-89.

²⁴ P.D Ross, S. Subramanian. *Biochemistry*. **1981**. 20, 3096-3102.

como un proceso de unión espontánea. Los valores de ΔH^0 y ΔS^0 también son negativos, lo que sugiere que el proceso de interacción está entálpicamente controlado y que los factores más importantes que contribuyen a la interacción son las fuerzas de van der Waals y la formación de puentes de hidrógeno.

También se realizaron las mediciones de EPR las cuales proporcionaron información adicional sobre el tipo de interacción de los complejos de cobre con la albúmina. Luego del tiempo de incubación (se realiza el mismo procedimiento que se usó en los experimentos de fluorescencia), se realizaron las determinaciones y se obtuvieron mediante la simulación de los espectros los parámetros de EPR para ambos complejos: complejo(1) $g_1 = 2,053$; $g_2 = 2,053$ y $g_3 = 2,224$ ($g_{iso} = 2,110$) y $A_1 = 8,99 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; $A_2 = 9,04 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $A_3 = 196,4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ($A_{iso} = 71,48 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_3/A_3 = 113,2$) y para el complejo(2) $g_1 = 2,065$, $g_2 = 2,038$ y $g_3 = 2,237$ ($g_{iso} = 2,113$) y $A_1 = 2,59 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$; $A_2 = 3,14 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ y $A_3 = 197,05 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ($A_{iso} = 67,74 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $g_3/A_3 = 113,5$). A modo de ejemplo se muestra los EPR experimental y simulado para el complejo (2) en la Figura 8.

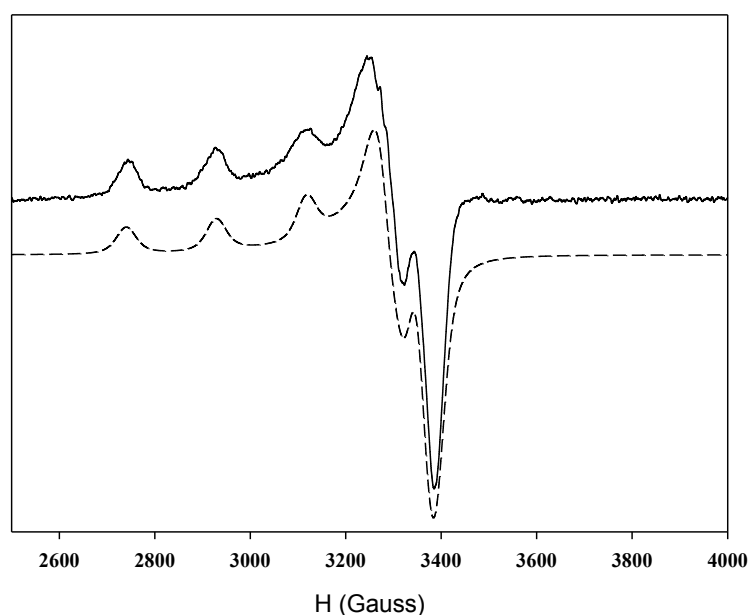


Figura 8. Banda X del espectro EPR del complejo $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ ($100\mu\text{M}$) con ASB ($6\mu\text{M}$) 120K (línea sólida) y simulado (líneas punteadas).

Los valores que se simularon para los complejos pueden ser atribuidos a los cambios en la esfera de coordinación en torno al centro de cobre. Los parámetros se ajustan con un entorno CuN_4 , teniendo en cuenta que la relación g_3/A_3 concuerda con el rango 110-120 el que sugiere una interacción del Cu(II) a través de los átomos de N de la albúmina²⁵ y un entorno de coordinación del tipo cuadrado plano distorsionado, conteniendo cuatro átomos de nitrógeno alrededor de Cu(II) . Estos cambios probablemente implican la pérdida de un

²⁵ V.C Silveira, M.P Abbott, M. Cavicchioli, M.B Gonçalves, H.M Petrilli, L de Rezende, A.T Amaral, D.E.P Fonseca, G.F Caramoric, A.M da Costa Ferreira. *Dalton Trans.* **2013.** 42, 6386-6396.

ligando lábil como el sulfato o el cloruro (para el caso del complejo(1)). La interacción con el cobre libre es descartada debido a que la relación esperada $g_3/A_3=107$, es distinta a la que se obtiene para los complejos y como los espectros no mostraron más de una señal en el EPR, se deduce que la señal es indicativa de la existencia de una sola especie en solución.

Como resultado de los estudios realizados se puede sugerir que la albúmina puede comportarse como una molécula transportadora para los complejos de cobre y que la interacción ocurre en el sitio de afinidad más baja ($K_a 10^3 M^{-1}$).

5.1.3. Fluorescencia 3D. Bispiroglutamato de Mg.

La investigación sobre la unión de la albúmina sérica con distintas drogas es muy importante desde el punto de vista del campo farmacológico y farmacodinámico. Como ya se mencionó, este estudio permite el control de la concentración activa brindando información acerca de cómo es la distribución, metabolismo y excreción. La espectroscopía de fluorescencia 3D se utiliza para estudiar el cambio conformacional de ASB después de interactuar con el compuesto de interés.

La Figura 9 presenta el espectro de fluorescencia 3D de la ASB en ausencia y presencia de ácido DL-pGlu y del complejo $Mg(DL-pGlu)_2$, respectivamente. El pico A ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 337,9 \text{ nm}$) refleja el comportamiento espectral de los residuos de triptófano y tirosina (Trp, Tyr) y la intensidad de fluorescencia de estos residuos está relacionada con la polaridad del microentorno. El pico B ($\lambda_{ex} = 230 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 340,3 \text{ nm}$) está asociado a la estructura de la cadena polipeptídica²⁶.

Como se puede ver en la Figura 9 y en la Tabla 3, el Pico A aumenta ligeramente su intensidad para el complejo y, en oposición, la interacción con el ligando disminuye ligeramente su intensidad en comparación con ASB. Aunque el proceso de *quenching* es el normalmente esperado, a veces se produce el aumento de la intensidad de la fluorescencia y esta observación se asocia a un posible proceso de intercalación.

El pico B disminuye su intensidad para el complejo metálico y aumenta para el ligando. Las modificaciones de este pico se han asociado con cambios en las cadenas peptídicas porque hay exposición de las regiones hidrófobas. Así, como puede verse, se producen diferentes tipos de interacciones generadas por el ligando y el complejo. La diferencia puede surgir de la carga total. El ligando, a pH fisiológico, se espera que esté desprotonado ($-COO^-$) y están involucradas las interacciones electrostáticas, mientras que el complejo neutro posiblemente prefiera el tipo de interacción covalente a través de los grupos NH libres en la molécula.

²⁶ Y. Wang, X. Wang, J. Wang, Y. Zhao, W. He, Z. Guo. *Inorg Chem.* **2011**. 50, 12661-12668.

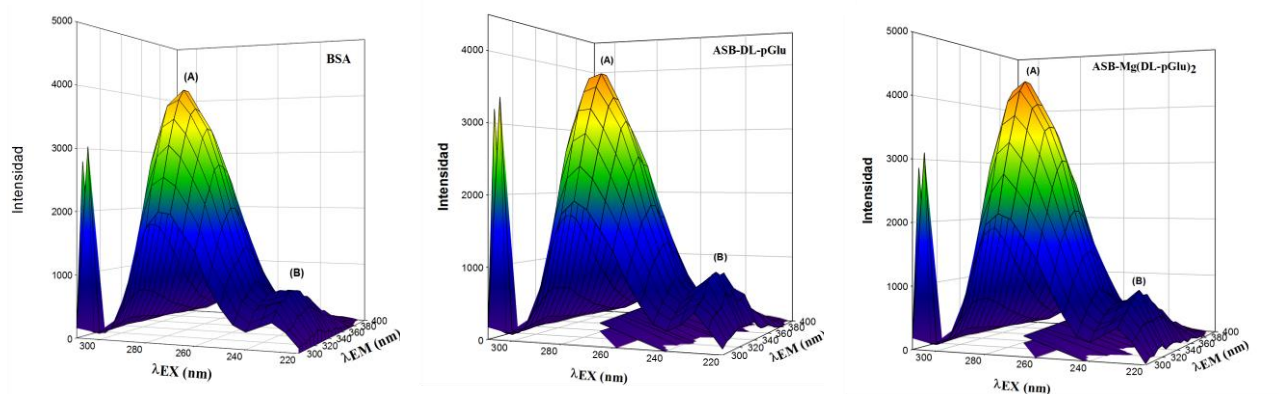


Figura 9. Espectro de fluorescencia tridimensional de: albúmina sérica (ASB, 6 μ M), ASB (6 μ M) - ácido DL-pGlu (500 μ M) y ASB (6 μ M) - Mg(DLpGlu)₂ (500 μ M).

Tabla 3. Parámetros espectrales de fluorescencia 3D para los sistemas: ASB, ASB-ácido DL-pGlu y complejo ASB-Mg(DL-pGlu)₂.

ASB

Posición del pico	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm/nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Intensidad
Pico A	280/337,9	57,9	4043,5
Pico B	230/340,3	110,3	577,6

Sistema ASB-ácidoDL-pGlu

Posición del pico	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm/nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Intensidad
Pico A	280/335,5	55,5	3814,3
Pico B	230/339,0	109	673,1

Sistema ASB- complejo Mg(Pyr)₂

Posición del pico	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm/nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Intensidad
Pico A	280/337,3	57,3	4215,3
Pico B	230/334,4	54,4	559,3

5. 1.4. Biodisponibilidad de [Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂·2H₂O con la ASB

Frente al interés que genera del estudio de la unión de la albúmina sérica como transportador fundamental de fármacos en el plasma sanguíneo, es fundamental poder determinar la actividad farmacológica del complejo de magnesio. En este contexto, la información relacionada con el catión es escasa y los conocimientos que se tienen de él están limitados a estudios de ultrafiltración competitiva con Ca(II) en los que se reportó que ambos poseen

constantes de disociación similares (10^2 - 10^3 M⁻¹).²⁷ Las mediciones de fluorescencia que fueron efectuadas utilizando MgCl₂ con albúmina sérica humana (ASH) no pudieron evidenciar cambios en la intensidad de la fluorescencia.²⁸ Se sabe que la presencia de Mg(II) favorece, en algunas circunstancias, la interacción de ligandos biológicos²⁸ con la ASB. Por esta razón hemos investigado la posible interacción entre el [Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂.2H₂O con la ASB. Cuando se hizo la determinación experimental usando la sal de MgCl₂ y la ASB, los resultados obtenidos fueron los mismos que los reportados para el sistema Mg(II)-ASH²⁸. Cuando se hizo la determinación para el ligando solo, N,N dimetilacetamida, éste tampoco produjo la disminución de la intensidad de la fluorescencia de la ASB.

En cambio en el complejo de magnesio se pudo evidenciar interacción hasta cierto punto. Para poder hacer este análisis, se midió la biodisponibilidad de estos complejos realizando las medidas con una longitud de onda de excitación de 280 nm a dos temperaturas 25 °C y 37 °C. La concentración de ASB permaneció fija en un valor de 6 µM, mientras que para el complejo se usó un rango amplio de concentraciones (0-1000 µM); en este caso se asumió este rango de concentraciones debido a que el Mg(II) fue previamente testeado en rango de valores de concentración similares.²⁹

A medida que se ensayó con los valores de mayor concentración del complejo, se apreció una leve disminución de la intensidad de la fluorescencia de la ASB hasta una concentración de 500 µM (Figura 10), en cambio cuando se emplearon los valores más altos de concentración se da lugar a un proceso de saturación, en donde no fue posible observar más cambios.

Los experimentos de “quenching” no mostraron un efecto muy significativo, pero son suficientes para poder estimar los valores de constante de Stern-Volmer, la constante de unión y los parámetros termodinámicos (ver Figura 11). De acuerdo a los valores calculados de los parámetros termodinámicos para el sistema en estudio, refleja que el proceso de interacción que se desarrolla entre la albúmina sérica y el complejo de magnesio ocurre de manera espontánea. Esto es determinado por el valor negativo en el cambio de energía libre (ΔG^0) que va acompañado por un valor positivo en la entropía (ΔS^0). El valor positivo en el cambio de entalpía (ΔH^0) sugiere que la interacción es endotérmica, lo cual es consistente con el incremento en el valor de la constante de asociación K_a con la temperatura³⁰ (Tabla 4).

²⁷ E.L Nemashkalova, E.A Permyakov, S.E Permyakov, E.A Litus. *Biometals*. **2017**. 30, 341-353.

²⁸ N. Seedher, P. Agarwal. *Drug Metab Drug Interact*. **2010**. 25(1-4), 17-24.

²⁹ W.F Bosron, .RA Anderson, M.C Falk, F.S Kenedy, B.L Vallee. *Biochemistry*. **1977**. 16, 610-614.

³⁰ V.D Suryawanshi, L.S Walekar, A.H Gore, P.V Anbhule, G.B Kolekar. *J Pharm Anal*. **2016**. 6, 56-63.

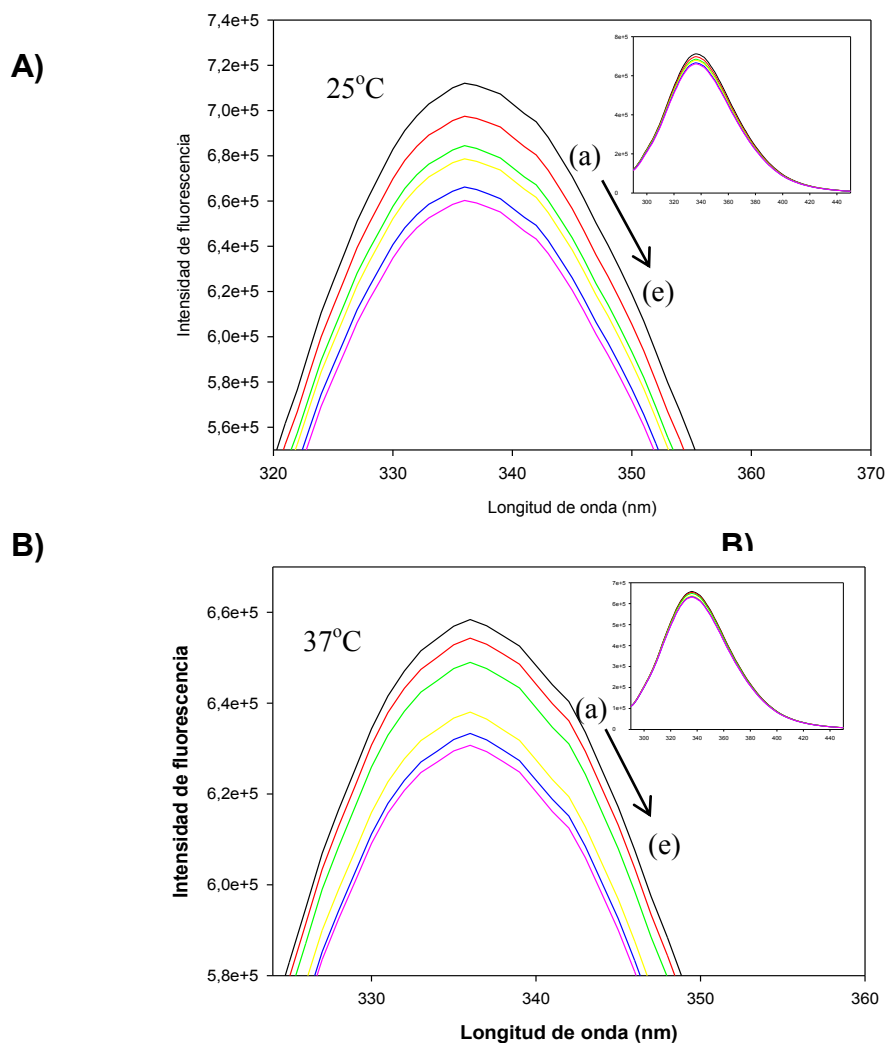


Figura 10. Espectros de fluorescencia para el sistema $\text{ASB}-[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: A) 25°C y B) 37°C . La concentración usada de ASB para todos los ensayos fue de $6\ \mu\text{M}$, y la concentración de complejo (μM) fue de: (a) 100; (b) 200; (c) 300; (d) 400 y (e) 500; ($\text{pH} = 7,4$; $\lambda_{\text{exc}} = 280\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336\ \text{nm}$).

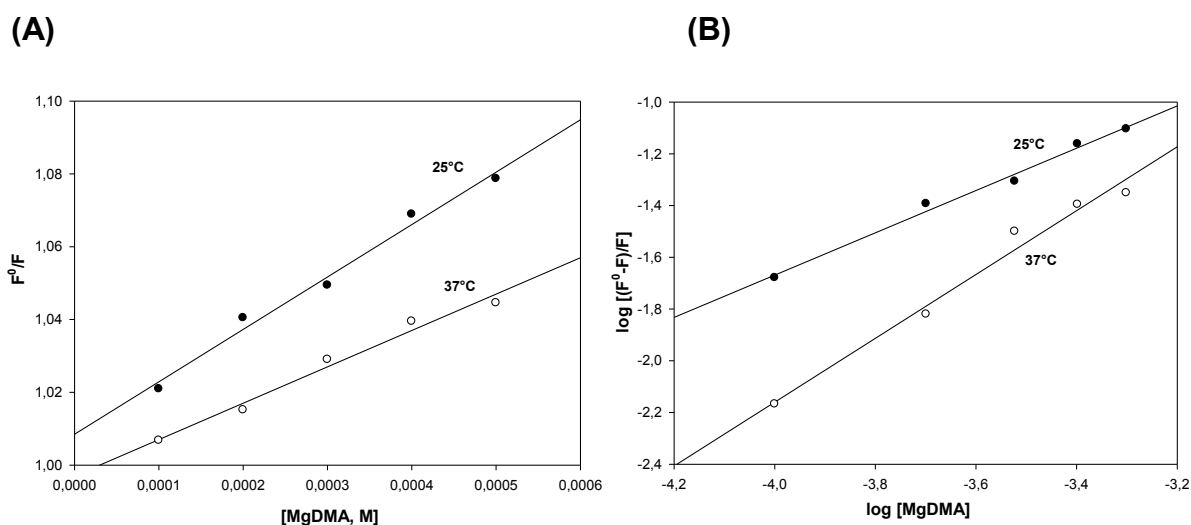


Figura 11. (A) Curva de Stern-Volmer F^0/F vs $Q\ [\text{M}]$ y (B) Curva de $\log [(F^0-F)/F]$ vs $\log[Q]$ para el sistema $\text{ASB}-[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 25°C y 37°C .

Tabla 4. Parámetros termodinámicos, constante de Stern Volmer (K_{sv}), constante de unión aparente (K_a), “n” sitios de unión para el sistema ASB-[Mg(DMA)₂(H₂O)₄]Cl₂.2H₂O.

pH	T(K)	$K_{sv} (M^{-1}) \times 10^2$ ±DS	$K_a (M^{-1})$ ±DS	n	$r^{2,a}$	ΔG^0 (KJ/mol)	ΔH^0 KJ/mol	ΔS^0 (J/mol.K)
7,4	298	14,40 ± 0,02	39,81 ± 0,15	0,82	0,99	-9,13	172,4	609,3
	310	9,98 ± 0,50	588,8 ± 11,7	1,23	0,98			

$r^{2,a}$, Coeficiente de correlación para los valores de K_a ,
DS: Desviación estándar

Para poder hacer una evaluación más completa de la unión, se estudió la interacción mediante espectroscopía UV-Vis. Para ello se midieron los espectros de la ASB (6 μ M) (Figura 12) y del sistema ASB 6 μ M-MgDMA 400 μ M. En el espectro de la albúmina se observa una banda localizada a 220 nm con una fuerte intensidad de absorción. Esta banda es generada por la transición conocida como $P \rightarrow P^*$ que se corresponde con la estructura principal del grupo C=O que se encuentra en el polipéptido de la estructura de la α -hélice. Se puede notar que esta banda aumentó su intensidad y cambió ligeramente a una longitud de onda más alta. De forma contraria, no se observaron cambios significativos en la banda ubicada a 280 nm (correspondientes a los residuos aromáticos) que se correlaciona con la polaridad del entorno alrededor de los residuos de triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) en la albúmina. Los resultados experimentales observados concuerdan con el hecho de que el “quenching” es débil y que el complejo de magnesio no es capaz de poder alterar en cierto grado la polaridad del entorno de los residuos Trp Tyr³¹.

³¹ D. Li, M. Zhu, C. Xu, B. Ji. *Eur J Med Chem.* **2011.** 46, 588-599.

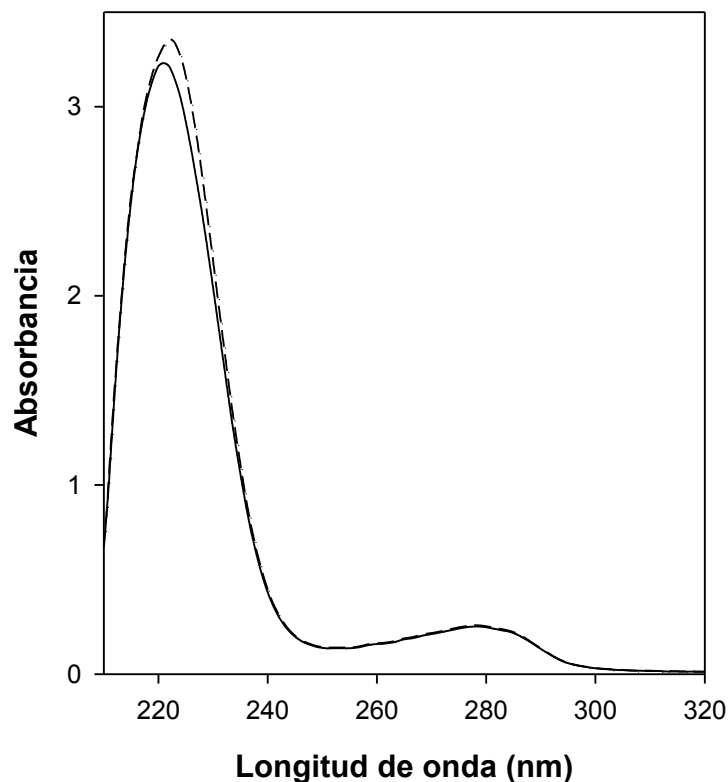


Figura 12. Espectro UV/vis de ASB 6 μM (línea sólida) y el sistema ASB 6 μM -MgDMA 400 μM (línea punteada).

Con el fin de poder respaldar estos resultados y tener mejores detalles de la interacción, se analizaron espectros de fluorescencia 3D. En la Figura 13A y 13B se presentan los espectros en tres dimensiones y un mapa de contorno para la ASB 6 μM y para el sistema ASB 6 μM -MgDMA 400 μM (igual concentraciones que en el UV/Vis). El Pico A revela el comportamiento que manifiestan los residuos de Trp y Tyr en el espectro obtenido. La intensidad de la fluorescencia se relaciona con la polaridad del entorno de estos aminoácidos. El Pico B se atribuye a una transición $n \rightarrow \pi^*$ que es característica de la estructura principal del polipéptido de la proteína.

En la Figura 13B se observa que la disminución en la intensidad del Pico B es más notable que el Pico A. Este cambio observado se marca en el diagrama de contorno del Pico B en el que se observa una disminución del área en el centro del ojo de la figura.

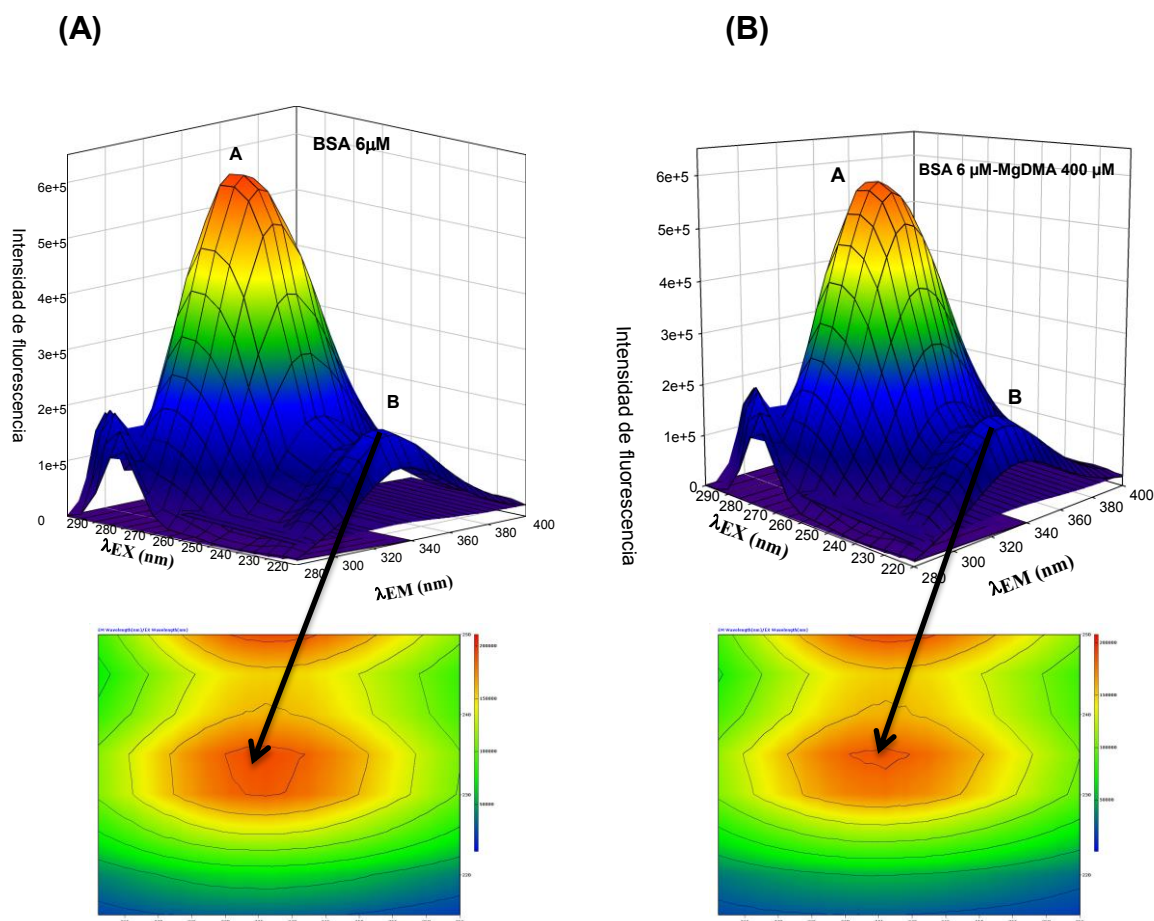


Figura 13. Espectro de fluorescencia en tres dimensiones (A) ASB 6 μM y (B) ASB 6 μM -MgDMA 400 μM y los mapas de contorno correspondientes los puntos a λ_{em} : 365 nm; λ_{ex} : 215 nm.

En base a estas observaciones, se puede concluir que la interacción con el complejo de Mg(II) indujo un cambio conformacional en la proteína que aumentó la exposición de las regiones que no están expuestas³². Además, si consideramos estudios previos que involucran la interacción de iones Mg(II) con albúmina mediante las técnicas de cromatografía o calorimetría^{33,34} se ha establecido que la unión del catión es dominante por interacciones electrostáticas entre su carga y la superficie opuestamente cargada de la ASH. En este contexto, y en todos los valores de pH, los parámetros termodinámicos ΔH^0 y ΔS^0 fueron positivos. Se consideró que las interacciones entre las especies iónicas en soluciones acuosas se caracterizan por pequeños cambios positivos de entalpía y cambios positivos de entropía y que el comportamiento termodinámico se ajusta al modelo que describe la atracción electrostática que ocurre entre las regiones no específicas cargadas negativamente de HSA y iones de prueba cargados positivamente³⁵. Si asumimos este tipo de interacción para el complejo y nos basamos en el ensayo de conductividad, donde en una solución acuosa, el complejo de magnesio puede describirse

³² X-L. Hana, P. Mei, Y. Liu, Q. Xiao, F-L. Jiang, R. Li. *Spectrochim Acta Part A*. **2009**. 74, 781-787.

³³ Y.C Guillaume, C. Guinchard, A. Berthelot. *Talanta*. **2000**. 53, 561-569.

³⁴ D.J Eatough, T.E Jensen, L.D Hansen. *Thermochim Acta*. **1978**. 25, 289-297.

³⁵ P. Ross, S. Subramanian. *Biochemistry*. **1981**. 20, 3096-3102.

como una especie cargada $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, podemos esperar obtener un comportamiento similar al $\text{Mg}(\text{II})$ con cierto grado de impedimentos estéricos. Desde el punto de vista de los parámetros termodinámicos, éstos fueron positivos como se esperaba para este tipo de interacción. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidarlos por completo.

5.2. Conclusiones

En este capítulo se determinó la interacción de los complejos estudiados $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ y los complejos derivados de cobre y metimazol: $[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1) y $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}]$ (2) con la proteína de transporte albúmina sérica bovina. Pudo demostrarse que los compuestos formaron complejos de asociación con ASB por medio de fuerzas de van der Waals y que los mismos pueden unirse y ser bio-transportados por la albúmina. Estas interacciones resultaron ser espontáneas.

Para el complejo Bispiroglutamato de Mg sólo fue posible determinar que existe interacción con ASB a través de estudios de fluorescencia 3D, dado que en vez de producir “quenching” de la fluorescencia se produjo un aumento de intensidad, probablemente por procesos de intercalación.

En el caso del complejo de magnesio con N,N-dimetilacetamida se evidenció muy poca interacción por medio de los experimentos de “quenching” donde las constantes calculadas están dentro del orden de magnitud esperado para los compuestos con $\text{Mg}(\text{II})$. También se demuestra que la asociación encontrada es de carácter espontáneo. Para este sistema, se pudo visualizar adicionalmente cambios en los espectros UV-Vis, en particular en la banda asociada a la estructura polipeptídica. Esos cambios también fueron visibles y respaldados por los espectros de fluorescencia 3D donde se presenta una marcada disminución del área de la región relacionada al Pico B característico de la cadena polipeptídica. Así en este caso se pudo sugerir una interacción del tipo electrostática similar a los establecido para el $\text{Mg}(\text{II})$.

CAPÍTULO 6

Actividades biológicas *in vivo*.

Capítulo 6. Actividades Biológicas *in vivo*

6.1. La depresión

La depresión es un trastorno psiquiátrico que afecta el estado de ánimo y es sumamente incapacitante. Por lo general se expresa como una sensación de tristeza o desgano, acompañado de la pérdida de interés en las tareas cotidianas y la pérdida del placer. Ocasionalmente cualquier persona sana puede sentirse melancólica o triste, pero estas emociones son pasajeras y desaparecen en pocos días, ya que éstas son capacidades emocionales que han aparecido a lo largo de la evolución en respuesta a distintas presiones selectivas, solucionando adaptativamente problemas concretos importantes para la supervivencia del ser humano, en cambio la depresión posee una duración suficiente como para interferir en la funcionalidad del individuo, ya que se ve afectado negativamente su forma de sentir, de actuar y de pensar.

No se conoce una única causa, por lo general se habla de una combinación de factores genéticos, bioquímicos y psicológicos. De acuerdo a los últimos estudios realizados con tomógrafos computados las áreas del cerebro responsables de la regulación del ánimo no funcionan con normalidad durante la depresión. Está demostrada la participación de diversos aspectos fisiopatológicos que influyen en el inicio de la depresión. Se han encontrado diferencias en el tamaño de varias estructuras cerebrales, como: el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal, además de cambios en el metabolismo y en el tamaño neuronal y de la densidad glial. Por otro lado algunos neurotransmisores y sustancias químicas del cerebro parecen estar en desequilibrio. Si bien estas son evidencias de la presencia de la depresión en el cerebro, no describen sus causas.

Es común que algunos tipos de depresión se transmitan de generación en generación, por lo que se cree que existe una predisposición genética a padecerla. Sin embargo algunas investigaciones sugieren que los factores ambientales también deben ser tenidos en cuenta.

6.1.1. Síntomas:

La evaluación diagnóstica de la depresión actual se basa en una clasificación de los trastornos mentales que se hallan en la quinta edición del *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSMV-2013), publicada por la Asociación Americana de Psiquiatría. En este manual proporciona diferentes categorías de la depresión y, se clasifica en los siguientes tipos:

- Desorden de depresión mayor
- Desorden bipolar (I y II)
- Desorden distímico
- Desorden ciclotímico
- Desórdenes del estado de ánimo debido a condiciones médicas y/o abuso de sustancias

Para poder confirmar un diagnóstico positivo, las manifestaciones clínicas de la enfermedad (ver Figura 1) deben tener una durabilidad de al menos dos semanas.

Los síntomas se condensan en áreas relacionadas con la afectividad, el pensamiento y la cognición, la conducta, y los trastornos somáticos.

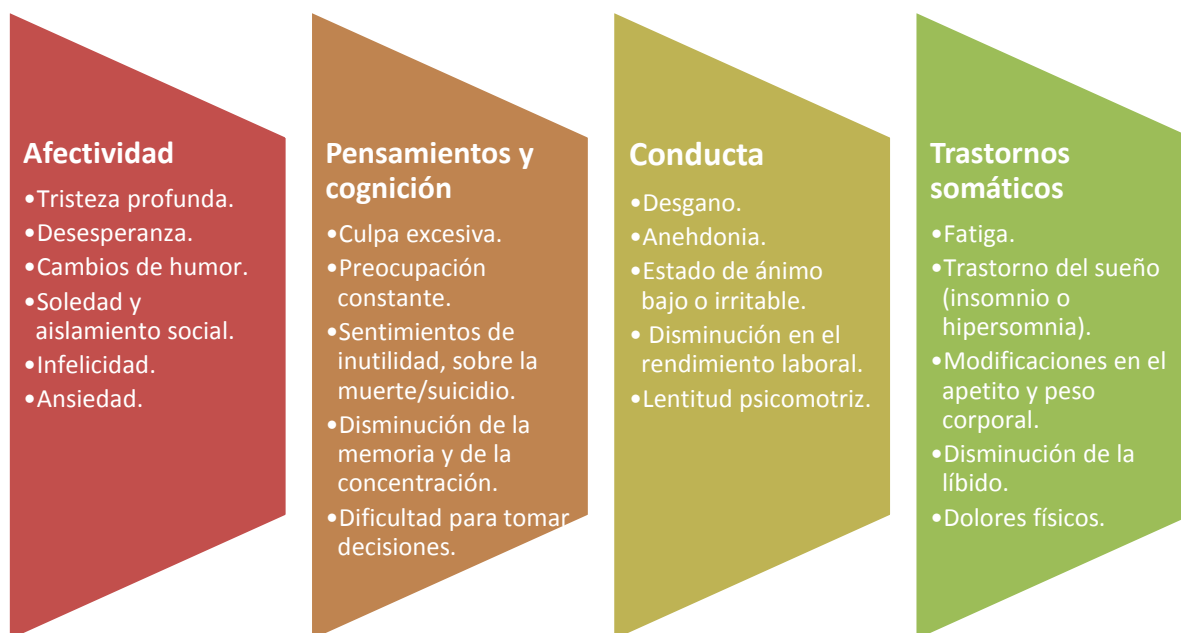


Figura 1. Síntomas clínicos de la depresión.

En forma más o menos frecuente, o insidiosamente otras veces, el paciente comienza a padecer abatimiento, tristeza, desgano, pérdida de interés por todo lo que lo rodea, e incapacidad para experimentar placer. La tristeza es habitualmente de intensidad progresiva, hasta llegar a veces a un estado de "*tristeza infinita*" como manifiestan algunos pacientes con depresión mayor. El pensamiento se vuelve lento, la ideación monotemática, con expresiones de dolor, culpa y vivencias de ruina inminente. Al mismo tiempo se comienza a descuidar las obligaciones laborales y familiares, con desaliño, falta de aseo, y manifestaciones similares, creándose un agudo problema social. También es factible observar diversos trastornos físicos y orgánicos como anorexia, pérdida de peso, trastornos funcionales digestivos y respiratorios, insomnio, falta de energía, embotamiento intelectual y franca disminución de la libido. El cuadro clínico se completa finalmente con ideas de autodestrucción, pensamientos relacionados con la muerte y el suicidio.

6.1.2 Epidemiología de la depresión

La depresión es uno de los trastornos mentales más frecuente y además una de las principales causas de discapacidad en el mundo. Esto es debido principalmente a la gran cantidad de personas que sufren esta enfermedad,

aproximadamente 400 millones (alrededor del 6% de la población global actual^{1,2}, se estima que en mayor proporción afecta a las mujeres.

Según las proyecciones de la depresión por parte la Organización mundial de la salud (OMS), para el año 2030 la depresión será una de las principales causas de discapacidad en el mundo^{3,4}, con mayor tasa de morbilidad, sólo por detrás de las enfermedades cardiovasculares⁵.

La depresión causa mayor deterioro en el estado de salud que las enfermedades crónicas como, la artritis, el asma o la diabetes. También agrava significativamente la salud de personas con problemas físicos crónicos en comparación con enfermedades físicas solas o incluso combinaciones de enfermedades físicas⁶. Además, se ha observado un mayor riesgo de muerte para un gran rango de problemas de salud físicos cuando se presentan de forma comórbida con depresión⁷.

Según el nuevo estudio *Global Burden of Disease*, la depression mayor (DM) se considera un factor de riesgo independiente en el desarrollo de la enfermedad coronaria^{8,9}.

Asimismo, también se considera la DM como un factor de riesgo para el suicidio¹⁰. El suicidio representa casi el 1% de todas las muertes, y casi dos tercios de ese porcentaje ocurren en personas con depresión¹¹. Dicho de otra manera, tener depresión aumenta el riesgo de suicidio algo más de cuatro veces en relación con la población general, y casi unas veinte veces si tenemos en cuenta los casos más graves de la enfermedad¹². También es interesante destacar que en las personas con DM la mortalidad se ve elevada¹³.

La DM tiene una prevalencia-vida estimada de alrededor del 15% en población general^{14,15}, aunque las estimaciones mundiales de la proporción de personas que es probable que experimenten DM a lo largo de su vida varían

¹ T. Vos, R.M Barber, B. Bell, A. Bertozzi-Villa, S. Biryukov, I Bolliger, C.J Murray. *Lancet*. **2015**. 386 (9995), 743-800.

² H.A Whiteford, L. Degenhardt, J. Rehm, A.J Baxter, A.J Ferrari, H.E Erskine, T. Vos. *Lancet*. **2013**. 382 (9904), 1575-1586.

³ C.D Mathers, D. Loncar. *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med*. **2006**. 3(11), 2011-2030.

⁴ C.J.L Murray, A.D Lopez. *The Global Burden of Disease: A Comprehensive Assessment of Mortality and Disability from Diseases, Injuries, and Risk Factors in 1990 and Projected to 2020* Cambridge, MA: Harvard University Press. **1996**.

⁵ H.A Whiteford, A.J Ferrari, L. Degenhardt, V. Feigin, T. Vos. *PloS One*. **2015**. 10(2), e0116820.

⁶ S. Moussavi, S. Chatterji, E. Verdes, A. Tandon, V. Patel, B. Ustun. *Lancet*. **2007**. 370(9590), 851-858.

⁷ P. Cassano, M. Fava. *J Psychosomatic Research*. **2002**. 53(4), 849-857.

⁸ J. Barth, M. Schumacher, C. Herrmann-Lingen. *Psychosom Med*. **2004**. 66(6), 802-813.

⁹ F.J Charlson, N.J.C Stapelberg, A.J Baxter, H.A Whiteford. *BMC Med*. **2011**. 9(1) 47.

¹⁰ Z. Li, A. Page, G. Martin, R. Taylor. *Soc Sci Med*. **2011**. 72(4), 608-616.

¹¹ N. Sartorius. *J Clin Psychiatry*. **2001**. 62, 8-11.

¹² J.M Bostwick, V.S Pankratz. *Am J Psychiatry*. **2000**. 157(12), 1925-1932.

¹³ L.R Wulsin, G.E Vaillant, V.E Wells. *Psychosom Med*. **1999**. 61(1), 6-17.

¹⁴ T. Kato. *Psychiat Clin Neuros*. **2007**. 61(1), 3-19.

ampliamente entre los diferentes estudios y parámetros usados en los mismos, así como entre países¹⁶. Las mejores estimaciones se encuentran entre el 4 y el 10%¹⁷.

La DM puede aparecer a cualquier edad, pero gran cantidad de casos empiezan en la adolescencia tardía, a principios-mediados de la edad adulta y en la adultez tardía. Los sondeos mundiales de salud mental (*World Mental Health surveys*; *WMH surveys*) reportan una edad de inicio de la enfermedad que va desde mediados-finales de la adolescencia, unos 18 años, hasta principios de los 40.

La depresión es más frecuente en las mujeres que en los hombres. Se demostró que las hormonas afectan directamente las sustancias químicas del cerebro que regulan las emociones y eso provoca que las mujeres sean más susceptibles de padecerla en determinados momentos de su vida. Mientras que en los hombres la dependencia al alcohol y los trastornos de conducta son los que ocupan los primeros dos lugares¹⁸.

6.1.3 Evolución y pronóstico

La aparición del primer episodio de DM suele ocurrir en la veintena, aunque puede ocurrir en cualquier momento desde la infancia temprana hasta la vejez¹⁹. La duración media de un episodio es de cuatro a seis meses, aunque en casos particulares puede alcanzar años²⁰. La DM puede llegar a hacerse crónica²¹, (en al menos el 10% de las personas), y es altamente recurrente en algunos individuos, pudiendo dificultar sensiblemente su ejercicio en el trabajo o el estudio, así como su capacidad para afrontar la vida diaria. Además, para muchas personas padecer un episodio depresivo las coloca en riesgo para la aparición de futuros episodios²². Al menos un 50% de las personas que han tenido un primer episodio depresivo volverán a tener un episodio más y, después del segundo y tercer episodios, el riesgo de recaída aumenta a un 70 y 90% en cada caso²³. En su forma más grave, la DM puede conducir al suicidio. Más del 15% de las personas con DM terminan así con su vida^{24,25,26}.

¹⁵ R.C Kessler, P. Berglund, O. Demler, R. Jin, D.Koretz, K.R Merikangas, P.S Wang. *JAMA*. **2003**. 289(23), 3095-3105.

¹⁶ R.C Kessler, E.J Bromet. *Annu Rev Publ Health*. **2013**. 34, 119-138.

¹⁷ P. Waraich, E.M Goldner, J.M Somers, L. Hsu. *Can J Psychiatry*. **2004**. 49(2), 124-138.

¹⁸ F. Wagner, F.C González, G.S Sánchez, P.C García, J.J Gallo. *Salud Ment*. **2012**. 35(1), 3-11.

¹⁹ M Fava, K.S Kendler. *Neuron*. **2000**. 28(2), 335-341.

²⁰ M.A Posternak, D.A Solomon, A.C Leon, T.I Mueller, M.T Shea, J. Endicott, M.B Keller. *J Nerv Ment Dis*. **2006**. 194(5), 324-329.

²¹ R.C Kessler, P. Berglund, O. Demler, R. Jin, D. Koretz, K.R Merikangas, P.S Wang. *J Am Med Assoc*. **2003**. 289(23), 3095-3105.

²² G.A Fava, S.K Park, N. Sonino. *Expert Rev Neurother*. **2006**. 6(11), 1735-1740.

²³ D.J Kupfer. *J Clin Psychol*. **1991**. 52, 28-34.

²⁴ D. Harwitz, L. Ravizza. *Emerg Med Clin N Am*. **2000**. 18(2), 263-271.

²⁵ J.K Lönnqvist. Psychiatric Aspects of Suicidal Behaviour: Depression. In K. Hawton and K. van Heeringen (Ed.), *The International Handbook of Suicide and Attempted Suicide*. West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd. **2000**.

²⁶ J.K Lönnqvist, M.M Henriksson, E.T Sisometsä, M.J Marttunen, M.E Heikkinen, H.M Aro, K.I Kuoppasalmi. *Psychiat Clin Neuros*. **1995**. 49(1), 111-116.

Cuando los síntomas son mínimos o están ausentes durante al menos tres semanas consecutivas, se asume que la enfermedad está en remisión y si no hay rastro de los síntomas durante al menos cuatro meses después de la remisión, se considera que la persona se ha recuperado del episodio²⁷.

Normalmente, haya o no tratamiento, los episodios depresivos se resuelven con el tiempo en la mayoría de los individuos, aunque también es cierto que un pequeño porcentaje no se recupera ni con tratamiento^{27, 28}.

6.2. Hipótesis biológicas actuales de la depresión

A pesar de su prevalencia y del impacto considerable en la salud humana, se conoce poco sobre las regiones cerebrales involucradas en la aparición de la enfermedad, los factores genéticos y ambientales desencadenantes y los mecanismos a través de los cuales se produce la condición depresiva. Este vacío de conocimiento contrasta con la información disponible para otros padecimientos comunes como la hipertensión, la diabetes tipo II y el cáncer. Esto se debe a dos razones principales: primero, el estudio de cambios patológicos a nivel del cerebro es mucho más complicado que para otros órganos. Las estrategias usadas para el análisis del cerebro se basan en estudios post mortem que permiten documentar algunas características de los circuitos cerebrales, y por las técnicas de neuroimagen²⁹. Sin embargo, estas metodologías, presentan algunas limitaciones: por un lado los estudios post mortem no son capaces de representar la totalidad de los procesos que ocurren normalmente en el organismo vivo, por otro lado el aumento o descenso de la actividad de ciertas regiones cerebrales utilizando técnicas de neuroimagen no son suficientes para detallar los mecanismos que están asociados con la amplia gama de síntomas de la depresión, lo cual desemboca en vacíos de conocimiento sobre los procesos subyacentes³⁰.

En la actualidad se cuenta con evidencia que implica diversos aspectos fisiológicos: los cambios en las estructuras cerebrales y su funcionamiento, la participación de las monoaminas, su metabolismo, el papel de sus transportadores y sus polimorfismos, y de otros neurotransmisores, como el glutamato y el ácido amino-γ-butírico (GABA), el papel de la neurogénesis, la interacción de la vulnerabilidad genética, el ambiente y el papel de los biomarcadores de la inflamación en la depresión. Aunque algunos de estos mecanismos se encuentran interrelacionados, por el momento no existe una explicación que logre unificarlos, por lo que más bien pareciera que la depresión mayor es un trastorno heterogéneo.

Hasta el momento, los sistemas cerebrales que han recibido mayor atención en los estudios neurobiológicos sobre DM han sido los sistemas de neurotransmisión monoaminérgicos.

²⁷ R.E Ingram. **2009.** *The International Encyclopedia of Depression.* (R.E Ingram, Ed.) *The International Encyclopedia of Depression.* New York: Springer Publishing Company.

²⁸ M. Posternak, I. Miller. *J Affect Disord.* **2001.** 66(2-3), 139-146.

²⁹ W.C Drevets. *Curr Opin Neurobiol.* **2001.** 11, 240-249

³⁰ E.A Phelps, J.E LeDoux. *Neuron.* **2005.** 48, 175-187.

6.2.1 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una monoamina neurotransmisora que principalmente se encuentra en el tracto gastrointestinal (cerca del 90%), las plaquetas y el cerebro³¹. La 5-HT modula el procesamiento neuronal de importantes funciones vegetativas y emocionales como el ánimo, el apetito, el deseo, la función sexual, el sueño³², y la memoria³³.

En los humanos, las alteraciones en el sistema serotoninérgico están relacionadas con trastornos conductuales y neurológicos que incluyen los alimenticios, la depresión³⁴, la epilepsia³⁵, la esquizofrenia³⁶ y la ansiedad³⁷.

La serotonina se sintetiza a partir del triptófano obtenido de la dieta, en las neuronas serotoninérgicas en el cerebro. Su síntesis tiene lugar en dos pasos (Figura 2). En primer lugar, se lleva a cabo la hidroxilación del triptófano, por medio de la triptofanhidroxilasa (TpH), que da lugar a 5-hidroxitriptófano. En segundo lugar, dicho metabolito sufre una descarboxilación, por medio de la enzima aminoácido-decarboxilasa, que da lugar, finalmente, a la serotonina. Tras su síntesis, es almacenada en vesículas intracelulares a la espera de ser liberada, cuando surja el estímulo adecuado.

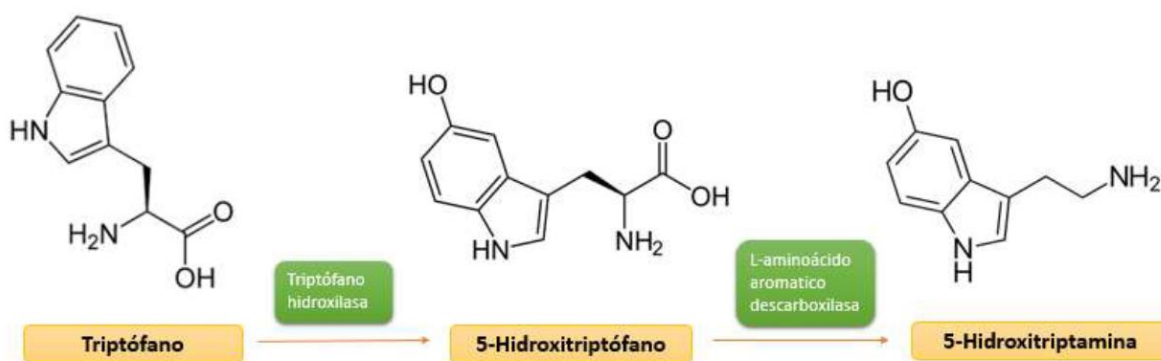


Figura 2. Síntesis de la serotonina.

La 5-HT es eliminada activamente al espacio extracelular gracias a la proteína transmembrana transportadora de 5-HT, conocida también como transportador de serotonina (5-HTT o SERT) seguida de la degradación intracelular llevada a cabo por la monoamino oxidasa tipo A (MAOA)³⁸, (Figura 3).

³¹ M. Berger, J.A Gray, B.L Roth. *Annu Rev Med.* **2009.** 60, 355-366.

³² T. Canli, K.P Lesch. *Nat Neurosci.* **2007.** 10(9), 1103-1109.

³³ M.V Puig, A.T Gullledge. *Mol Neurobiol.* **2011.** 44(3), 449-464.

³⁴ V. Arango, M.D Underwood, J.J Mann. *Prog Brain Res.* **2002.** 136, 443-453.

³⁵ P.C Jobe, J.W Dailey, J.F Wernicke. *Crit Rev Neurobiol.* **1999.** 13, 317-356.

³⁶ T. Brieden, M. Ujeyl, D. Naber. *Pharmacopsychiatry.* **2002.** 35, 83-89.

³⁷ M.A Jenike, S.L Rauch, J.L Cummings, C.R Savage. *J Clin Psychiatry.* **1996.** 57, 492-503.

³⁸ M.B.H Youdim, Y.S Bakhle. *Br J Pharmacol.* **2006.** 147(1), 287-296.

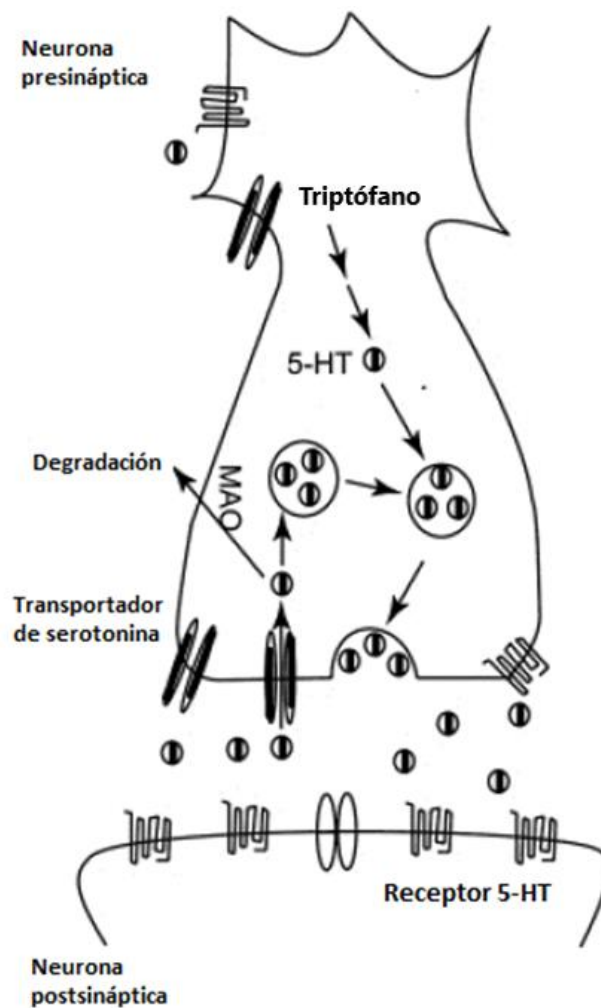


Figura 3. Representación de una neurotransmisión serotoninérgica.

El sistema serotoninérgico es el sistema de neurotransmisión más grande del cerebro. (Ver Figura 4). Está constituido por un conjunto de núcleos que nace en la línea media del cerebro (núcleos del rafe) que contienen neuronas en su gran mayoría serotoninérgicas, que sintetizan 5-HT. Estas neuronas de los núcleos del rafe son la fuente principal de liberación de 5-HT. Las proyecciones de las neuronas serotoninérgicas forman uno de los sistemas anatómicos y funcionales más complejos y extensos del cerebro de los mamíferos³⁹ (ganglios basales, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal). A través de estas proyecciones, la serotonina participa en el control de los estados de sueño y vigilia, el ánimo, las emociones, el control de la temperatura, la dieta, la conducta sexual, algunos tipos de depresión, etc.

Cuando las fibras serotoninérgicas de alguna área del cerebro son eliminadas, tanto su estructura como su función quedan comprometidas. La pérdida de 5-HT en el cerebro puede modificar la adaptabilidad y estabilidad del tejido neuronal para responder adecuadamente frente a estímulos externos. La

³⁹ B.L Jacobs, E.C Azmitia. *Physiol Rev.* **1992.** 72 (1), 165-229.

pérdida de la homeostasis neuronal podría estar implicada en el origen de los trastornos mentales⁴⁰.

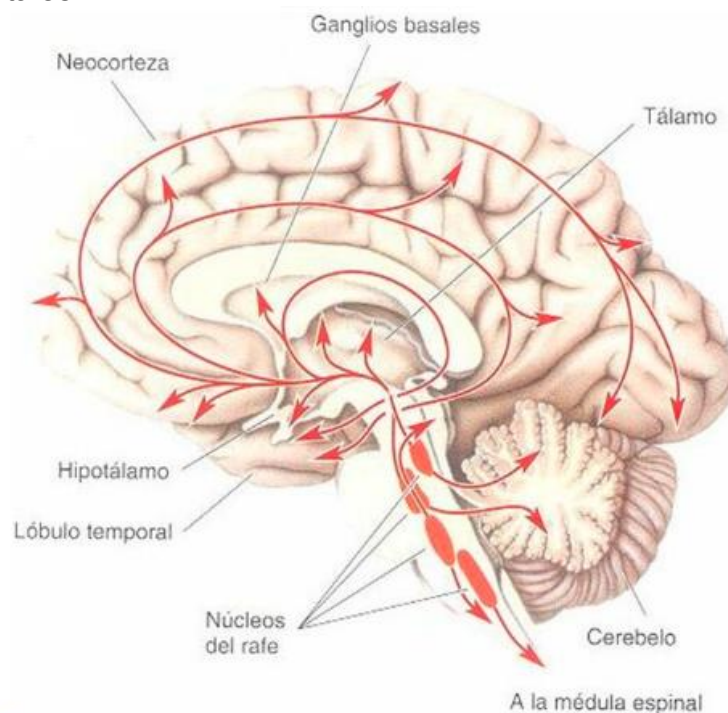


Figura 4. Sistema serotoninérgico.

6.2.2. Hipótesis monoaminérgica

La investigación para establecer el principio funcional de los primeros antidepresivos, permitió determinar que la enfermedad está asociada con una disminución de monoaminas en el espacio sináptico y esto llevó a la postulación de la hipótesis monoaminérgica de la depresión⁴¹.

En esta hipótesis se propone que la enfermedad se debe a una deficiencia de la actividad monoaminérgica cerebral (déficit en la transmisión de serotonina, noradrenalina y dopamina en sitios cerebrales clave) por una disminución en la cantidad de neurotransmisores y que puede ser tratada con drogas que incrementen esta actividad⁴². De hecho, varios tipos de antidepresivos facilitan la transmisión monoaminérgica reduciendo los síntomas depresivos^{43,44}. Sin embargo, esta facilitación representa sólo una parte de la acción de los antidepresivos, por lo que tratar de explicar sus efectos terapéuticos

⁴⁰ E.C Azmitia. *Neuropsychopharmacology*. **1999**. 21, 33-45.

⁴¹ J.J Schildkraut. *Am J Psychiatry*. **1965**. 122, 509-522

⁴² I. Hindmarch. *Eur Psychiatry*. **2002**. 17(3), 294-299.

⁴³ M.J Millan. *Eur J Pharmacol*. **2004**. 500, 371-384.

⁴⁴ O. Berton, E.J Nestler. *Nature Rev Neurosci*. **2006**. 7, 137-151.

únicamente a través de este mecanismo, es una visión bastante restringida del panorama general.

Las monoaminas, noradrenalina (NA), adrenalina (A) y dopamina (DA) se conocen también como catecolaminas. Y estos son neurotransmisores que son sintetizados a partir de tirosina, en tanto que la otra monoamina importante, la serotonina (5-HT), es una indolamina, que se sintetiza a partir del triptófano. Estas catecolaminas se concentran en vesículas en la región terminal de la neurona pre-sináptica y son liberadas durante la sinapsis nerviosa, permitiendo la transmisión del impulso nervioso de una neurona a la otra⁴⁵. La acción de las monoaminas finaliza con su recaptura llevada a cabo por la neurona presináptica y/o las células gliales o por la acción de enzimas extra e intracelulares que las degradan.

Los niveles de monoaminas son regulados mediante neurotransportadores dependientes de Na^+/Cl^- , los cuales presentan dominios transmembrana y controlan la concentración del neurotransmisor mediante la rápida recaptura por parte de las terminales nerviosas, manteniendo así bajas concentraciones en el espacio sináptico^{46, 47}. Por otro lado, la presencia de la monoamina oxidasa (MAO)⁴⁸ en las neuronas, se encarga de metabolizar las catecolaminas, lo que determina las cantidades de neurotransmisores almacenados y liberados durante la transmisión.

Los antidepresivos actuales están diseñados para incrementar la transmisión de monoaminas de manera aguda, inhibiendo la recaptura o bien la degradación de neurotransmisores⁴⁹.

La hipótesis de las monoaminas fue, durante mucho tiempo, punto clave en la investigación de la depresión. Sin embargo, la evidencia recopilada demuestra que la sola alteración del sistema monoaminérgico no puede ser considerada ni la única causa y quizás tampoco la principal en el surgimiento de la enfermedad. Aunque muchos antidepresivos favorecen la transmisión monoaminérgica, el tratamiento requiere semanas para poder reducir los síntomas depresivos, además, la disminución de monoaminas puede generar efectos en el ánimo de pacientes deprimidos, pero no de controles sanos.

Por lo anterior, se hace necesario tomar en cuenta el amplio espectro de factores involucrados en la etiología, de forma que se logren establecer los mecanismos que, junto con la alteración en la vía de las monoaminas, posiblemente están involucrados en la enfermedad.

6.2.3. Hipotésis glutamatérgica:

Las limitaciones de la teoría monoaminérgica llevaron a la implicación de otros sistemas de neurotransmisión para intentar explicar el origen de la depresión.

⁴⁵ P.W Gold, G.P Chrousos. *Mol Psychiatry*. **2002**. 7(3), 254-275.

⁴⁶ N. Nelson. *J Neurochem*. **1998**. 71, 1785-803.

⁴⁷ J. Masson, C. Sagne, M. Hamon, S. El Mestikawy. *Pharmacol Rev*. **1999**. 51, 439-464.

⁴⁸ I.J Kopin. *Pharmacol Rev*. **1985**. 37, 333-364.

⁴⁹ O. Berton, E.J Nestler. *Nature Rev Neurosci*. **2006**. 7, 137-151.

La “hipótesis glutamatérgica de la depresión” postula la existencia de una alteración entre los dos principales sistemas de neurotransmisión: glutamato y GABA, fundamentalmente a nivel cortical. Esta hipótesis ha sido formulada en base a que la quetamina, un fármaco utilizado como anestésico que bloquea los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato, mostraba una eficacia antidepressiva rápida.

En condiciones fisiológicas las sinapsis glutamatérgicas y las vías de señalización intracelulares, son mantenidas y reguladas por circuitos cerebrales mediados por la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Teniendo en cuenta que en la depresión se producen cambios en la integridad sináptica y en el funcionamiento de las neuronas glutamatérgicas excitadoras en la corteza prefrontal (caracterizada por una atrofia neuronal y pérdida de la conectividad sináptica) se puede generar una disfunción de los circuitos neuroquímicos en la corteza prefrontal necesarios para la ejecución de respuestas adaptativas. También es conocido que el estrés crónico produce una alteración de los circuitos inhibitorios gabaérgicos a nivel cortical, lo que influye sobre la excitabilidad neuronal en la corteza prefrontal provocando alteraciones cognitivas⁵⁰. Por otra parte, las modificaciones de la excitabilidad cortical pueden influir sobre los circuitos monoaminérgicos del cerebro desencadenando una “hipofuncionalidad” de los sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos que proyectan a áreas límbicas y que serían responsables de la sintomatología depresiva.

Uno de los resultados más consistentes y aceptados en depresión es la reducción glial en cerebros de pacientes deprimidos^{51,52}. Las funciones principales de la glía son: a) regulación de la concentración sináptica de glutamato (GLU), b) metabolismo y homeostasis cerebral, c) liberación de factores tróficos en el desarrollo, y d) mantenimiento de las redes sinápticas. Atendiendo a estas funciones, la relación GLU-glía parece crucial en la fisiopatología de la depresión.

El exceso de GLU conduce a la activación de los receptores NMDA fuera de la sinapsis. La hiperactivación de estos receptores aumenta el calcio intracelular a un nivel que disminuye en lugar de aumentar al BDNF produciendo atrofia y muerte celular. La degeneración de las células gliales que evitan el exceso de glutamato, puede acelerar este proceso. O sea que la toxicidad del glutamato participa en la fisiopatología de trastornos depresivos.

Un estudio en pacientes deprimidos mostró concentraciones elevadas de GLU y bajas de GABA en pacientes con depresión no medicados⁵³. Además, se ha

⁵⁰ S. Ghosal, B. Hare, R.S Duman. *Arch Gen Psychiatry*. **2017**. 61, 705-713.

⁵¹ G. Rajkowska, J.J Miguel-Hidalgo. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **2007**. 6(3), 219-233.

⁵² R.D Gosselin, S. Gibney, O. O'Malley, T.G Dinan, J.F Cryan. *Neuroscience*. **2009**. 159(2), 915-925.

⁵³ G. Sanacora, R. Gueorguieva, C.N Epperson, Y.T Wu, M. Appel, D.L Rothman. *Arch Gen Psychiatry*. **2004**. 61(7), 705-713.

descrito una disminución de la recaptación de glutamato en corteza, estriado y córtex prefrontal⁵⁴. Estudios con resonancia magnética en pacientes con depresión, reflejan una disminución las concentraciones de GLU en el córtex cingulado anterior y en la amígdala, siendo no concluyentes en el hipocampo y en el córtex occipital⁵⁵.

De acuerdo a esto, las alteraciones gliales descritas en pacientes con depresión provocarían una reducción en la recaptación de GLU y por tanto, la concentración extracelular de este neurotransmisor sería muy elevada. Esto provocaría daño neuronal como consecuencia del efecto neurotóxico y una reducción de la función del factor BDNF afectando al receptor antagonista NMDA⁵³.

6.3. TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS

El objetivo principal del tratamiento, tanto para DM como para otras enfermedades mentales, es mejorar la calidad de vida del paciente y de los que le rodean, y en algunos casos ayudar a reintegrar al enfermo en su entorno social, laboral y familiar²⁷. Esta intervención pretende el alivio de los síntomas y a la recuperación de la función de la persona, y, a largo plazo, prevenir recaídas⁵⁶.

Actualmente, la terapia más efectiva para la depresión moderada o grave es una combinación de medicamentos antidepresivos y psicoterapia profesional, mientras que para la depresión leve, los tratamientos psicosociales y asesoría sin fármacos pueden ser suficientes⁵⁷.

6.3.1 Los antidepresivos (ADs)

Los agentes antidepresivos actuales tienen un efecto serotoninérgico o catecolaminérgico, ya sea actuando a nivel presináptico o bien actuando como agonistas o antagonistas de los receptores postsinápticos. Estos mecanismos finalmente concluyen en la misma vía común, cual es, favorecer la transmisión monoaminérgica. En base a estas formas diferentes de actuar (Figura 5, 6), se puede realizar una clasificación funcional de los antidepresivos categorizándolos en tres grupos:

⁵⁴ R.F Almeida, A.P Thomazi, G.F Godinho, J.A Saute, S.T Wofchuk, D.O Souza. *Neurochem Res.* **2010**. 35(8), 1164-1171.

⁵⁵ E. Sibille, F. Beverly. *Int J Neuropsychoph.* **2013**. 16(8), 1893-1909.

⁵⁶ H. Kaplan, B. Sadock. *Sinopsis de psiquiatría*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S.A. **1999**. 593-656.

⁵⁷ M. Marcus, M.T Yasamy, M. van Ommeren, D. Chisholm. *Depression, a global public health concern*. Retrieved from http://www.who.int/mental_health/management/depression/who_paper_depression_wfmh_2012.pdf. **2012**.



Figura 5. Clasificación de los antidepresivos según su mecanismo de acción, tomado de Richelson y colaboradores⁵⁸.

- 1) ADs Inhibidores de las enzimas que metabolizan los neurotransmisores.** Son los **(IMAOs)**, inhibidores de la monoaminoxidasa. Su mecanismo de acción como antidepresivos consiste en inhibir la desaminación oxidativa de los neurotransmisores como la noradrenalina, 5-HT, la serotonina y la dopamina, incrementando su disponibilidad ya que elevan la concentración extracelular (espacio sináptico) de las monoaminas.
- 2) ADs Bloqueadores de la recaptación de neurotransmisores.** Este grupo de drogas está representado por: los antidepresivos tricíclicos (ADT), los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), los agentes duales, los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (IRNA) y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NA) y dopamina (DA)⁵⁹.

Los ISRS son los fármacos de primera línea en el tratamiento de la depresión más utilizados actualmente en la práctica clínica y han desplazado a otros grupos de antidepresivos en las últimas décadas. Son más seguros y presentan menos efectos adversos comparados con otros tipos de antidepresivos. Su mecanismo principal de acción es la inhibición de la recaptación de serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT). a nivel pre-sináptico lo que determina una neurotrasmisión serotoninérgica aumentada y prolongada. Este efecto produce en primer lugar, un incremento de 5-HT en la región somatodendrítica, seguido de una desensibilización de los auto-receptores de serotonina 5-HT1A, un incremento de la liberación de 5-HT del terminal

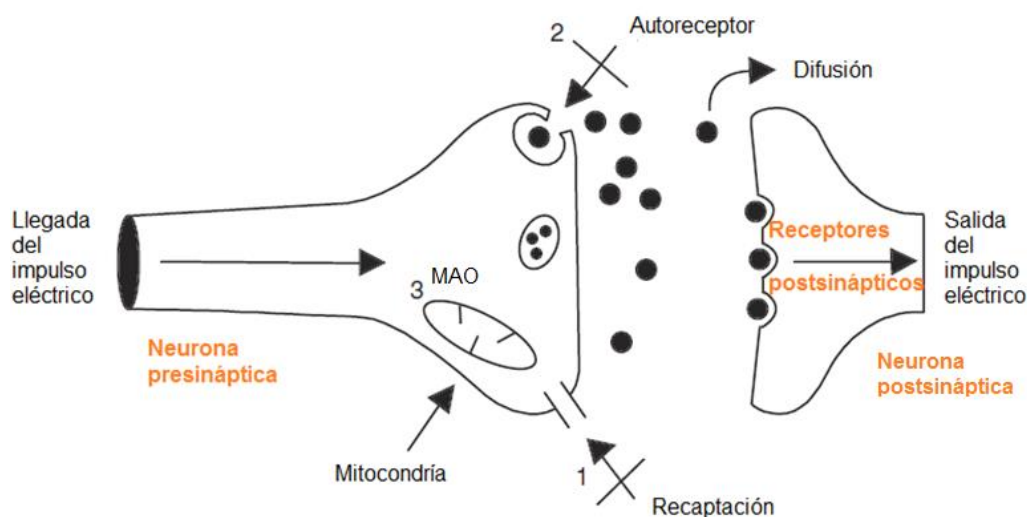
⁵⁸ R. Richelson. *Mayo Clin Proc.* **2001**. 76, 511-527.

⁵⁹ S.M Stahl. *J Clin Psychiatry.* **1998**. 59, 5-14.

nervioso, y finalmente la desensibilización de receptores postsinápticos serotoninérgicos⁶⁰.

Los agentes duales son fármacos que se caracterizan por su acción mixta a nivel noradrenérgico y serotoninérgico. Están representados por la venlafaxina y la duloxetina. Ambos inhiben la recaptación de 5-HT, de NA y en menor medida de la DA, aunque con diferente intensidad. Así la duloxetina a bajas dosis ya ejerce acción dual⁶¹, mientras que la venlafaxina necesita dosis más altas para realizar esta acción mixta. Los IRNA están representados por la reboxetina. Este antidepresivo ejerce un bloqueo selectivo de la recaptación de NA y presenta un buen perfil de seguridad y buena tolerancia⁶². Los inhibidores de la recaptación de NA y DA tienen como molécula de referencia al bupropion. Su mecanismo de acción se caracteriza por incrementar el recambio de NA, y bloquear la recaptación de DA. No interacciona con receptores histamínicos, ni colinérgicos, ni alfa-adrenérgicos⁶³.

3) ADs Bloqueadores de receptores presinápticos. Estos ADs producen una acción antagonista a nivel de los adrenoreceptores alfa 2 presinápticos, consiguiendo un incremento de la liberación de NA y 5-HT.



- 1- Inhibidores de la recaptación de neurotransmisores.
- 2- Bloqueo del receptor presinápticos para neurotransmisores.
- 3- Inhibidores de las enzimas que metabolizan neurotransmisores.

Figura 6. Descripción de los principales mecanismos de acción de los antidepresivos: A) En la *neurona presináptica* se realiza la síntesis del neurotransmisor (NT), su liberación y también su metabolización por la monoaminoxidasa (MAO), B) En la *neurona postsináptica* se produce la unión del NT con su receptor específico, y C) En el *espacio sináptico* difunde el NT. Se describe en la neurona presináptica los autoreceptores presinápticos; el cual permite la captación o ingreso del NT una vez liberado, hacia el interior de la neurona presináptica.

⁶⁰ (a) D.S Charney, D.B Menekes, G.R Heninger. *Arch Gen Psychiatry* **1981**. 38, 1160-1180; (b) P. Blier, C. Montigny, Y. Chaput. *J Clin Psychopharmacol.* **1987**. 7, 24-35.

⁶¹ A.F Schatzberg. *J Clin Psychiatry.* **2003**. 64, 30-37.

⁶² M. Mucci. *J Psychopharmacol.* **1997**. 11, 33-37.

⁶³ J.P Feighner. *J Clin Psychiatry.* **1999**. 60, 4-11.

6.4. Relación entre tiroides y depresión:

La hormona tiroidea (TH) tiene importantes acciones en el sistema nervioso central. Se ha reconocido que las disfunciones tiroideas causan manifestaciones significativas en la salud mental. Pueden conducir a perturbaciones en las emociones y la cognición. Tanto el aumento como la disminución de la función tiroidea pueden causar anomalías en el estado de ánimo. Recíprocamente, la depresión también puede ir de la mano con disfunciones sutiles de tiroides⁶⁴.

Aún en la actualidad uno de los errores más comunes que cometen los médicos es que no buscan ninguna comorbilidad psiquiátrica en estos pacientes. Muchos estudios han revelado que hay niveles significativamente alterados de T3, T4 y hormona estimulante de la tiroides (TSH) en pacientes con depresión^{65,66}.

La TH tiene un efecto en el sistema nervioso central (SNC) durante toda la vida. Regula la expresión génica en la mielinización, la diferenciación de las células neuronales y gliales, y la viabilidad neuronal. La TH juega un papel en el desarrollo neurológico normal. Estimula el desarrollo de procesos neuronales, axones y dendritas, aumenta la tasa de proliferación neuronal. Su efecto sobre la serotonina (5-hidroxitriptamina (5-HT)) se explica por la desensibilización del autorreceptor de 5-HT_{1A} en el sitio de los núcleos del rafe, lo que probablemente da como resultado un aumento de la liberación de serotonina^{67,68,69}.

El mecanismo de la actividad TH en el cerebro no está claro debido a la complejidad de la interacción de la tiroides con la neurotransmisión. Una hipótesis indicó que TH modula los receptores beta-adrenérgicos postsinápticos en la corteza cerebral y en el cerebelo, mientras que otros sostienen que es responsable de la modulación de 5-HT y sus receptores, lo que ocurre debido a la inhibición causada por el TH en el rafe, causando reducción en los niveles de 5-HT^{70,71}.

TH afecta y gobierna el SNC tanto durante la fase de desarrollo como durante toda la vida. Tanto los estados hiper e hipotiroideos tienen comorbilidad con afecciones psiquiátricas. Del mismo modo, los pacientes con trastornos del estado de ánimo también muestran trastorno en la hormona liberadora de TSH, mientras que T3 y T4 puede permanecer normal^{72,73,74,75}.

⁶⁴ O.M Wolkowitz, A.J Rothschild. *Psychoneuroendocrinology*. **2003**. 419-444.

⁶⁵ G.C Boral, A.B Ghosh, S.K Pal, K.K Ghosh, D.N Nandi. *Indian J Psychiat*. **1980**. 22, 200-202.

⁶⁶ J. Saxena, P.N Singh, U. Srivastava, A.Q Siddiqui. *Indian J Psychiat*. **2000**. 42, 243-246.

⁶⁷ M. Bauer, A. Heinz, P.C Whybrow. *Mol Psychiatry*. **2002**. 7, 140-156.

⁶⁸ J. Bernal, J. Nunez. *Eur J Endocrinol*. **1995**. 133, 390-398.

⁶⁹ J.W Smith, A.T Evans, B. Costall, J.W Smythe. *Neurosci Biobehav Rev*. **2002**. 26, 45-60.

⁷⁰ C.K Atterwill, S.J Bunn, D.J Atkinson, S.L Smith, D.J Heal. *J Neural Transm*. **1984**. 59, 43-55.

⁷¹ R.H Belmaker, G. Agam. *N Engl J Med*. **2008**. 358, 55-68.

⁷² M. Bauer, A. Heinz, P.C Whybrow. *Mol Psychiatry*. **2002**. 7, 140-156.

⁷³ J. Bernal, J. Nunez. *Eur J Endocrinol*. **1995**. 133, 390-398.

⁷⁴ R.H Belmaker, G. Agam. *N Engl J Med*. **2008**. 358, 55-68.

Varios datos sugieren que el eje hipotalámico- hipófisis -tiroides (HHT) está implicado en la patogénesis de la depresión. La mayoría de los estudios muestran cambios en diferentes hormonas en el eje HHT, con unos pocos estudios que muestran rango TH normal durante el episodio depresivo⁷⁶.

6.5. Actividad Antidepresiva

6.5.1. Actividad antidepresiva de (SerH₂)₂[CuCl₄]

En la actualidad el rol que cumple el cobre en los desórdenes afectivos no se encuentra completamente establecido pero existen evidencias de su rol en los trastornos del estado de ánimo⁷⁷. Como se sabe, este bioelemento es un componente esencial de algunas enzimas que están involucradas con el recambio de las catecolaminas (monoamina oxidasa-MAO, dopamina β-hidroxilasa-DBH, y tirosina hidroxilasa) que presentan cierta influencia en la fisiopatología de la depresión⁷⁸ y pueden realizar perturbaciones en la actividad glutamatérgica que se relaciona con la depresión¹.

Se sabe que el cerebro es el mayor reservorio de cobre y que el mismo se encuentra presente en varios sistemas biológicos. En relación a este elemento, muchísimos estudios realizados en personas depresivas mostraron reducidos los niveles séricos de cobre¹. Esta deficiencia, que también se observó en el cerebro de ratas, se relacionó con la disminución de la concentración de dopamina y noradrenalina⁷⁹.

Por ese motivo, resulta interesante investigar cuál es la eficacia de las sales de cobre al usarse como agentes antidepresivos. Es por ello que evaluamos cómo este bioelemento es capaz de producir un efecto sinérgico en la actividad antidepresiva de la sertralina actuando como un anión en este nuevo compuesto sintetizado.

De acuerdo a nuestros estudios previos^{80,81} realizados utilizando la prueba de natación forzada (PNF), a los 14 días del tratamiento crónico con sertralina como antidepresivo (10,0 mg/Kg, *po* (per os, vía oral)) se reduce de forma significativa la inmovilidad y a su vez aumenta la conducta natatoria pero sin variar la conducta de trepar, indicando todo este comportamiento el efecto antidepresivo de la reconocida droga. Por lo contrario a una dosis mayor (20,0 mg/Kg) no se producen cambios sobre las conductas depresivas del animal.

⁷⁵ P. Linkowski, H. Brauman, J. Mendlewicz. *J Affect Disord.* **1981.** 3, 9-16.

⁷⁶ V. Forman-Hoffman, R.A Philibert. *Acta Psychiatr Scand.* **2006.** 114, 132-139.

⁷⁷ K. Styczeń, M. Sowa-Kućma, M. Siwek, D. Dudek, W. Reczyński, P. Misztak, B. Szewczyk, R. Topór-Mądry, W. Opoka, G. Nowak. *Biol Trace Elem Res.* **2016.** 174, 287-293.

⁷⁸ K. Młyniec, M. Gawel, U. Doboszewska, G. Starowicz, K. Pytka, C.L Davies, B. Budziszewska. *Pharmacology.* **2015.** 67, 187-194.

⁷⁹ R.F Morgan, B.L O'Dell. *J Neurochem.* **1977.** 28, 207-213.

⁸⁰ G.E Escudero, C.H Laino, G.A Echeverría, O.E Piro, N. Martini, A.N Rodríguez, J.J Martínez Medina, L.L López Tévez, E.G Ferrer, P.A.M Williams. *Chem Biol Interact.* **2016.** 249, 46-55.

⁸¹ G.E Escudero, C.H Laino, N. Martini, G.A Echeverría, O.E Piro, P.A.M Williams, E.G Ferrer. **2015.** (Patente N°. 20150103320-Argentina).

Con fines comparativos, se realizaron también determinaciones usando las dos concentraciones de la sal de cobre $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,70 y 5,40 mg/Kg) que son proporcionales a las presentes en las dosis del complejo y pudo determinarse que no modificaron los comportamientos de natación, inmovilidad y escalamiento comparados con los controles salinos.

Al contrario con lo descripto para las sales de cobre y sertralina, el nuevo compuesto $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ mostró tener un efecto antidepresivo dependiente de la dosis cuando se lo compara con los controles salinos (Figura 7). El mismo disminuye el tiempo de inmovilidad, se incrementa el comportamiento natatorio sin afectar la conducta de trepar y su efecto es superior al producido por la propia sertralina. El mecanismo de acción que se sugiere para la sal es similar al de la sertralina, como inhibidor selectivo del consumo de serotonina (IRSSs), teniendo en este caso un efecto más potente.

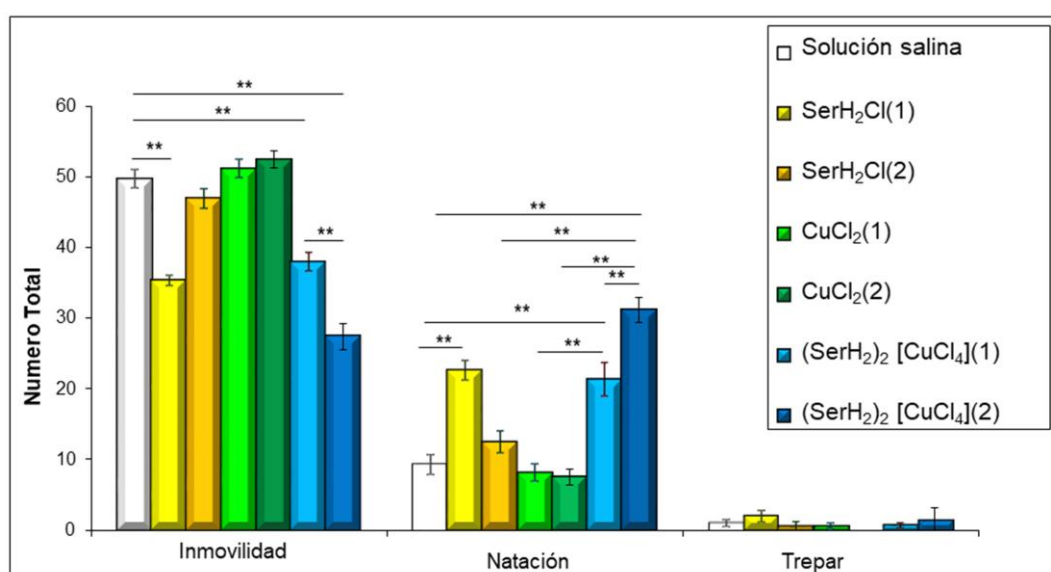


Figura 7. Test de natación forzado (PNF o FST): Efecto de los tratamientos de sertralina, CuCl_2 y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ sobre el comportamiento en ratas Wistar. Las barras representan el número de la media \pm S.E.M. *P < 0,05, **P < 0,01; 5-10 ratas/grupo. Solución salina; Cu (CuCl_2) (1) 2,70 mg/Kg y (2) 5,40 mg/Kg; SerH₂Cl (sertralina): (1) 10,0 mg/Kg y (2) 20,0 mg/Kg; $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (1): 13,3 mg/Kg y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (2): 26,6 mg/Kg. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de ANOVA seguido del test de Bonferroni.

Al no verse ningún efecto en los cambios conductuales con las dosis utilizadas del complejo, se descarta la posibilidad de que los niveles de cobre se hayan re-establecido. Se propone en cambio que el metal podría actuar de forma sinérgica con la sertralina e inhibiría posiblemente los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)¹. El motivo de esta observación se basa en el hecho de que el ión Cu(II) , comparte propiedades químicas y biológicas similares con el ión Zn(II) (respecto a su tamaño, valencia, algunas funciones biológicas en el sistema nervioso, entre otras). Además, algún efecto adicional puede esperarse debido a su demostrada actividad símil SOD. Por lo tanto se deben realizar en el futuro, estudios que ayuden a una mejor comprensión del mecanismo de acción que ejerce $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ cuando actúa como agente antidepresivo.

Para descartar la posibilidad de que el compuesto actúe de manera inespecífica sobre el sistema nervioso central, se realiza la prueba de campo abierto (PCA) (Figura.8)

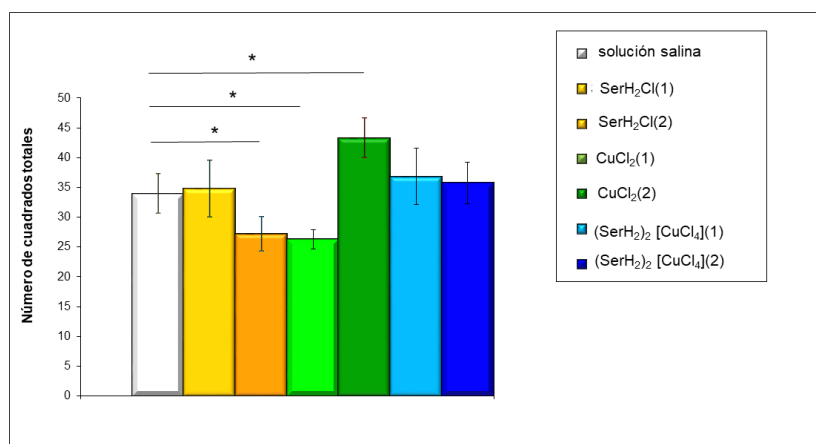


Figura 8. Efectos del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ sobre la actividad locomotora. Los resultados se expresan en media \pm SEM ($n = 5-10$ ratas/grupo). Dosis: sal: tratamiento con solución salina, Cu: tratamiento con cloruro de Cu(II) (2,70 y 5,40 mg/Kg), sert: tratamiento con clorhidrato de sertralina (10,0 y 20,0 mg/Kg), $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ -1: tratamiento con 13,3 mg/Kg y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ -2: tratamiento con 26,6 mg/Kg. Los datos se analizaron con ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Los resultados obtenidos indican que los tratamientos realizados con las dosis probadas de CuCl_2 , sertralina (SerH_2Cl) y el $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ no afectan la actividad locomotora confirmando la especificidad de los resultados de la PNF.

Uno de los efectos secundarios no deseados por el consumo tratamiento con sertralina es la pérdida de peso (efecto anorexigénico)^{82,83}. Por ello se analizó el cambio en el peso corporal en los animales durante todo el tratamiento. Se reporta, que en el tratamiento crónico con sertralina existe una disminución de peso corporal que es dependiente de la dosis suministrada de la misma. En la Figura 9 se presentan los resultados obtenidos. Puede verse que en el grupo de animales que recibió la dosis más alta de sertralina fue el que más peso perdió comparado con el del grupo control. En cambio después de la administración de CuCl_2 y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ no se ven cambios en el peso corporal. Se puede entonces concluir que $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ suprime el efecto anorexigénico que produce la sertralina.

⁸² S. Ranjbar, N.B Pai, C. Deng. *J Health Allied Sci.* **2013.** 12, 1-9.

⁸³ E. Richelson. *Mayo Clin Proc.* **2001.** 76, 511-527.

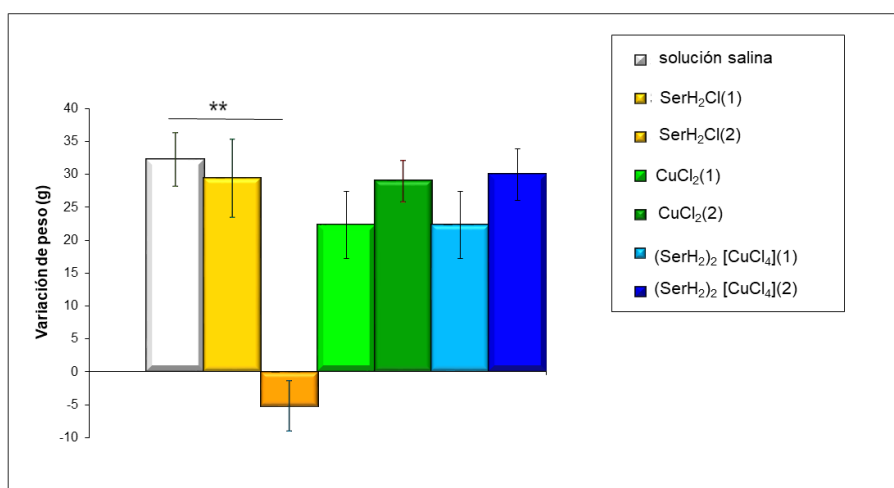


Figura 9. Efecto de los tratamientos con sertralina (SerH₂Cl), CuCl₂ y (SerH₂)₂[CuCl₄] sobre la variación de peso corporal de los animales. Los resultados se expresan en media \pm S.E.M, **P < 0,01, (5-10 ratas/grupo). Solución salina; Cu (CuCl₂) (1) 2,70 mg/Kg y (2) 5,40 mg/Kg; SerH₂Cl: (1) 10,0 mg/Kg Y (2) 20,0 mg/Kg; tratamiento (1) (SerH₂)₂[CuCl₄]: 13,3 mg/Kg) y tratamiento (SerH₂)₂[CuCl₄] (2): 26,6 mg/Kg. Los datos son analizados con tratamiento ANOVA, seguido del test de Tukey's para comparaciones múltiples.

6.5.2. Actividad antidepresiva Mg(DL-pGlu)₂

El efecto antidepresivo de los iones Mg(II) ya fue reportado en experimentos previos. Poleszak y colaboradores probaron cloruro sulfato e hidroaspartato de magnesio (en tratamientos crónico y agudo, con 20,0 y 30,0 mg(Mg)/Kg de dosis, mediante administración intraperitoneal (*ip*)) en ratones albinos suizos⁸⁴ y se pudo observar que la reducción del comportamiento de inmovilidad llegó al 20-30%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Decollogne y colaboradores⁸⁵ en ratones OF1 (para el tratamiento agudo, mediante administración *ip*, para la dosis de 30 mg(Mg)/Kg). Otras pruebas fueron realizadas reduciendo la cantidad de magnesio⁸⁶ en ratones (C57BL/6J ratones, por 4 semanas) y en humanos⁸⁷ por la administración combinada de Mg(II) con antidepresivos típicos^{88,89}. Poleszak y colaboradores realizaron además experimentos en ratas Wistar macho, que demostraron la influencia que posee el magnesio en reducir el tiempo de inmovilidad⁹⁰. En nuestros experimentos, las ratas Wistar son tratadas con los compuestos pero la forma

⁸⁴ E. Poleszak, B. Szewczyk, E. Kedzierska, P. Wlaż, A. Pilc, G. Nowak. *Biochem Behav.* **2004.** 78, 7-12.

⁸⁵ S. Decollogne, A. Tomas, C. Lecerf, E. Adamowicz, M. Seman. *Pharmacol Biochem Behav.* **1997.** 58, 261-268.

⁸⁶ N. Singewald, C. Sinner, A. Hetzenauer, S.B Sartori, H. Murck. *Neuropharmacology.* **2004.** 47, 1189-1197.

⁸⁷ G.A Eby, K.L Eby. *Med Hypotheses.* **2006.** 67, 362-370.

⁸⁸ E. Poleszak, P. Wlaż, B. Szewczyk, E. Kedzierska, E. Wyska, T. Librowski, J. Szymura-Oleksiak, S. Fidecka, A. Pilc, G. Nowak. *Pharmacol Biochem Behav.* **2005.** 81, 524-529.

⁸⁹ E. Poleszak, P. Wlaż, E. Kedzierska, D. Nieoczym, E. Wyska, J. Szymura-Oleksiak, S. Fidecka, M. Radziwoń-Zaleska, G. Nowak. *Pharmacol Rep.* **2006.** 58, 746-752.

⁹⁰ E. Poleszak, P. Wlaż, E. Kedzierska, M. Radziwoń-Zaleska, A. Pilc, S. Fidecka, G. Nowak. *Pharmacol Rep.* **2005.** 57, 654-658.

de administración fue vía oral porque el compuesto es altamente soluble en agua.

Yamamoto y colaboradores⁹¹ estudiaron el efecto antidepresivo de los péptidos de piroglutamilos en ratones, y en este contexto determinaron que el ácido piroglutámico (10 mg/Kg, ip.) no posee actividad. Por otra parte, en trabajos relacionados a la farmacología, se ha mencionado⁹² el piroglutamato de magnesio (el contenido Mg(II) en el pidolato de magnesio es del 8%,) pero si bien el trabajo determina efectos antidepresivos, este compuesto no fue usado para su determinación.

La actividad antidepresiva del ácido DL-piroglutámico y del complejo Mg(DL-pGlu)₂ fue evaluada usando el test Prueba de natación forzada (PNF)⁹³. La sal de magnesio (MgCl₂) también fue probada para evaluar por comparación con la actividad que demuestre el nuevo compuesto su potencial comportamiento sinérgico y para poder compararlo así con los datos ya reportados. Se muestra en la Figura 10 cuál es el efecto del tratamiento crónico con Mg(DL-pGlu)₂ sobre el tiempo de duración de la inmovilidad en las animales. Para el Mg(II) (MgCl₂ 20 y 30 mg(Mg)/Kg) y para el ácido DL-pGlu (en una dosis proporcional a la usada por el complejo metálico) lo que se observa es que no existe modificación significativa sobre el tiempo de inmovilidad.

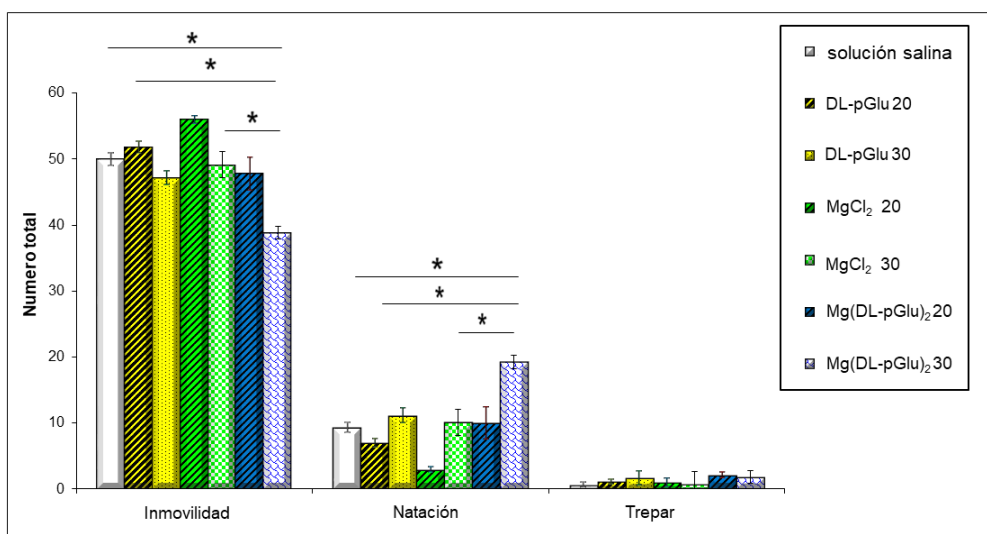


Figura 10. (A) Prueba de Natación Forzada (PNF): Efecto de los tratamientos Mg(DL-pGlu)₂, MgCl₂ y ácido DL-pGlu sobre el comportamiento en ratas Wistar. Las barras representan el número de la media \pm S.E.M. *P < 0,05, **P < 0,01; 6-10 ratas/grupo. Dosis: sal: tratamiento con solución salina, tratamiento con Mg(DL-pGlu)₂ y MgCl₂ (20 y 30 mg(Mg)/Kg), tratamiento con ácido DL-pGlu, los valores de 20 y 30 están referidos a las dosis proporcionales usadas considerando al complejo metálico 20 y 30 mg(Mg)/Kg. Los datos se analizaron con ANOVA de dos vías, seguido del método de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples.

⁹¹ Y. Yamamoto, T. Mizushige, Y. Mori, Y. Shimmura, R. Fukutomi, R. Kanamoto, K. Ohinata. *Neuropeptides*. **2015**. 51, 25-29.

⁹² G.M Sheldrick. *Acta Cryst*. **2015**. 71, 3-8.

⁹³ R.D Porsolt, G. Anton, N. Blavet, M. Jalfre. *Eur J Pharmacol*. **1978**. 47, 379-391.

De una forma interesante, para la dosis más alta que se ensayó de $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ (30 $\text{mg}(\text{Mg})/\text{Kg}$), el tiempo de inmovilidad se redujo un 22 % y fue acompañado con un incremento significativo en el tiempo de natación de 106 % sin afectar considerablemente el comportamiento de trepar.

Con la dosis más baja del complejo (20 $\text{mg}(\text{Mg})/\text{Kg}$) no hubo cambio significativo en el tiempo de inmovilidad cuando se compara con el grupo control ($p > 0,05$). Como consecuencia, el efecto observado puede atribuirse completamente a la presencia del complejo y puede descartarse que esté ocurriendo un comportamiento sinérgico como cuando se administra un tratamiento combinado, en el cual ni el ligando ni el metal muestran actividad⁹⁴.

Como se ha comentado previamente, los datos en la literatura relacionado con los complejos de magnesio respecto a la actividad antidepresiva son muy escasos. Se sabe que el hidroaspartato de magnesio resultó ser un antidepresivo efectivo con una dosis de 30 $\text{mg}(\text{Mg})/\text{Kg}$ cuando fue administrado mediante vía intraperitoneal en ratones suizos albinos pero no podemos realizar una comparación directa debido a la diferencia de los animales utilizados.

Por otra parte también se evaluó el actividad locomotora espontánea del complejo $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ (Figura 11). En la figura se incluyen los efectos del MgCl_2 y del ácido DL-pGlu para efectos comparativos. Ninguno de estos tratamientos afectó los niveles de actividad cuando las ratas son sometidas a la prueba del campo abierto.

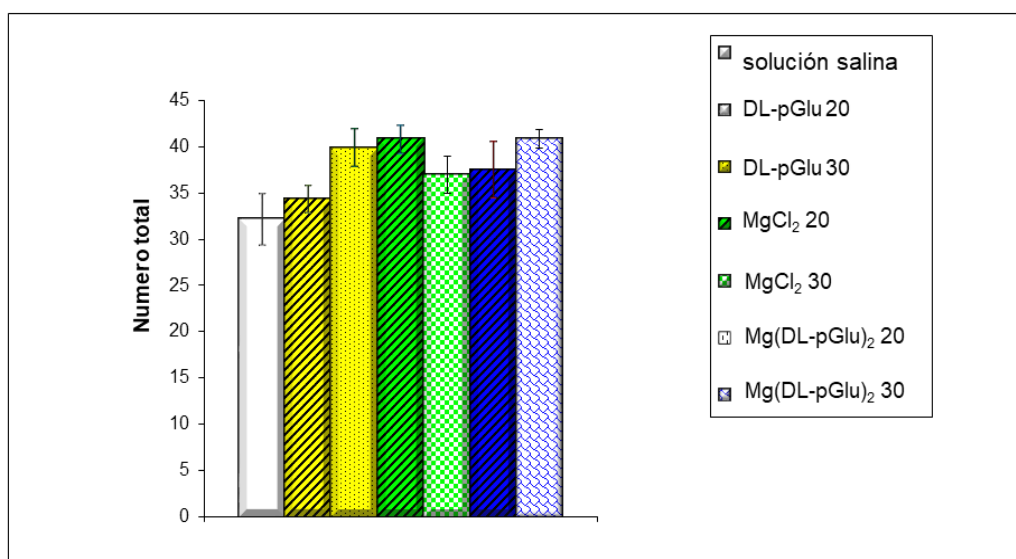


Figura 11. Efecto del tratamiento con $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$, MgCl_2 y ácido DL-pGlu sobre la actividad locomotora espontánea (Prueba de campo abierto, PCA). Las barras representan el número de recuentos durante el período de prueba de 5 minutos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n = 5-10$ ratas/grupo). Dosis: sal: tratamiento con solución salina, tratamiento con $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ y MgCl_2 (20 y 30 $\text{mg}(\text{Mg})/\text{Kg}$), tratamiento con ácido DL-pGlu, los valores de 20 y 30 están referidos a las dosis proporcionales usadas considerando al complejo metálico 20 y 30 $\text{mg}(\text{Mg})/\text{Kg}$. Los datos se analizaron con ANOVA una vía, seguido del método de Tukey para comparaciones múltiples.

⁹⁴ G.B Jameson, S. Schneider, E. Dubler, H.R Oswald. *Acta Cryst.* **1982.** 38, 3016-3020.

Esta prueba nos permite asegurarnos que las alteraciones observadas durante PNF no se deben a los cambios en la actividad motora, confirmando la especificidad del mismo. Entonces los cambios en la inmovilidad pueden así atribuirse al efecto producido exclusivamente por el $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$.

Como se mencionara, los antidepresivos son conocidos por inducir cambios en el peso corporal cuando estos son administrados en forma crónica^{6,7}. Como consecuencia, es importante su control después de los tratamientos. En ese sentido se realizaron los controles pertinentes durante el tratamiento. Se pudo observar que al final de los experimentos el peso corporal no fue afectado en ninguno de los tratamientos realizados (Figura 12).

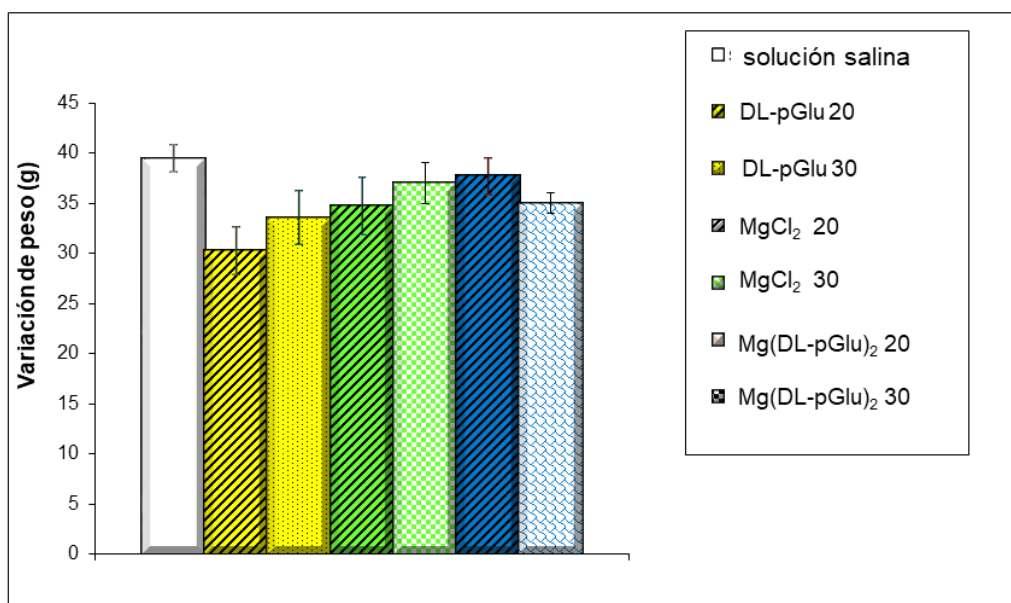


Figura 12. Efectos de los tratamientos con $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$, MgCl_2 y ácido DL-pGlu en la variación de peso corporal de los animales. Los resultados se expresan como la media \pm S.E.M, (n = 5-10 ratas por grupo). Los datos se analizaron test de ANOVA una vía, seguido del método de Tukey para comparaciones múltiples.

6.6. Actividad Analgésica

6.6.1. Relación entre el dolor y la depresión

Según la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor, el dolor se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable que está asociada con daño tisular real o potencial⁹⁵. El dolor crónico es aceptado como un dolor que posee un tiempo de duración que va de tres a seis meses⁹³. El dolor crónico o persistente parece estar asociado recíprocamente con trastornos de depresión y ansiedad. Se estima que la prevalencia del dolor crónico es del

⁹⁵ H. Merskey, M. Bogduk. Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms, IASP Press, Seattle, Wash, USA. **1994**.

20%, mientras que 1 de cada 10 personas son diagnosticadas recientemente con dolor crónico cada año⁹⁶.

Es común que aquellas personas que tienen dolor asociado a un trastorno de salud como pueden ser por la diabetes, el cáncer, o una enfermedad cardíaca termine desencadenando un estado depresivo.

La eficacia antiálgica de los antidepresivos es independiente de su efecto antidepresivo. Estos fármacos alivian el dolor a dosis inferiores a las que habitualmente se emplean para tratar la depresión y su efecto antiálgico se constata en pacientes con dolor y sin depresión. Su utilización es más frecuente en el dolor crónico de carácter neuropático y funcional⁹⁷.

Se ha demostrado cada vez más que la relación que existe entre los trastornos del estado de ánimo y el dolor agudo posee un vínculo que es bidireccional, y ambos actúan como factores de riesgo que se retroalimentan entre sí. Esto a menudo puede crear un círculo vicioso en que el dolor empeora los síntomas de la depresión, y la depresión resultante empeora los síntomas del dolor. Estudios epidemiológicos han demostrado que padecer dolor incrementa hasta cuatro veces el riesgo de contraer depresión^{98,99,100}. De forma similar, pacientes que padecen depresión mayor tienen hasta tres veces posibilidad de padecer dolor y hasta seis veces de sufrir dolor neuropático^{96,101}.

De la misma manera, la depresión causa síntomas físicos sin explicación. Se ha demostrado que los síntomas físicos de dolor, pueden ser las primeras manifestaciones en pacientes deprimidos, como lo son aquellos dolores que se generan en la zona lumbar, del cuello, gastrointestinal, articular, muscular y en la cabeza^{102,103,104}.

El tratamiento terapéutico para el manejo del dolor puede tener un efecto bidireccional. El tratamiento temprano para la depresión no solo reduce el riesgo de desarrollar dolor crónico; sino que también el tratamiento adecuado del dolor agudo disminuye la posibilidad de que los pacientes sufran depresión¹⁰⁵.

Cuando ambas enfermedades se manifiestan simultáneamente existen enfoques farmacológicos que ayudan a tratarlo al mismo tiempo. La mayoría de las personas con dolor crónico no manifiestan una depresión clínica, sí rasgos

⁹⁶ D.S Goldberg, S.J McGee. *BMC Public Health*. **2011**. 11(770), 1-5.

⁹⁷ J. Flórez, J.A Armijo, A. Mediavilla. *Farmacología humana*. Barcelona: Masson. **2001**.

⁹⁸ P. Zis, A. Daskalaki, I. Bountouni, P. Sykioti, G. Varrassi, A. Paladini. *Clin Interv Aging*. **2017**. 12, 709-720.

⁹⁹ L. McCarthy, M. Bigal, M. Katz, C. Derby, R. Lipton. *J Am Geriatr Soc*. **2010**. 57(1), 115-119.

¹⁰⁰ H. Bauer, R.T Emeny, J. Baumert, K.H Ladwig. *Eur J Pain*. **2016**. 20(8), 1253-1265.

¹⁰¹ T. Jackson, H. Chen, T. Lezzi, M. Yee, F. Chen. *Clin J Pain*. **2014**. 30(4), 346-352.

¹⁰² M.H Trivedi. *J Clin Psychiatry*. **2004**. 6(1), 12-16.

¹⁰³ N.Rijavec, V.N Grubic. *Psychiatr Danub*. **2012**. 24(4), 346-352.

¹⁰⁴ G. Simon, M. Vonkorff, M. Piccinelli, C. Fullerton, J. Ormel. *N Engl J Med*. **1999**. 341(18), 1329-1335.

¹⁰⁵ A. Michaelides, P. Zis. *Postgrad Med*. **2019**. 131(7), 438-444.

depresivos, estos últimos al investigarlos frecuentemente son reactivos al problema del dolor y sufrimiento, disminuyendo y/o desapareciendo al aplicar un plan terapéutico adecuado. La utilización de coadyuvantes (aquellos grupos de drogas que terapéuticamente colaboran y contribuyen a la analgesia producida por otros fármacos), han demostrado gran utilidad en el tratamiento del dolor crónico.

6.6.1.1. Relación neurobiológica entre el dolor y la depresión:

En la transmisión del dolor intervienen numerosos mecanismos de señalización que van desde la periferia (Sistema Nervioso Periférico) hasta el cerebro (Sistema Nervioso Central, SNC). Una vez en el cerebro, el dolor se transmite al tálamo y a la corteza, donde se originan los componentes sensoriales del dolor, lo que nos va a permitir localizar el dolor y describir su intensidad. En paralelo, otras vías mandan el mensaje de dolor al sistema límbico, donde se producen los componentes afectivos del dolor. Es por esto por lo que, a menudo, el dolor crónico se relaciona con comorbilidades como depresión y ansiedad^{106,107}.

Cuando la depresión es padecida junto con el dolor, esto ocurre de esta manera porque se relacionan entre sí desde múltiples niveles, psicológico, conductual y neurobiológicos. Desde la perspectiva de la neurobiología coinciden en el tipo de neurotransmisores (glutamato, noradrenalina, serotonina) que están involucrados la depresión, y se ha encontrado que la enfermedad también desempeña un papel crítico en la modulación del dolor^{108,109,110}.

La serotonina (5-hidroxitriptofano (5-HT)) como mencionamos es una monoamina neurotransmisora, desempeña un papel importante tanto en la nocicepción como en la regulación del estado de ánimo^{111,112,113}. Este neurotransmisor ha sido durante mucho tiempo asociado con la regulación central y periférica de la señal nociceptiva¹¹⁴ y las alteraciones en el sistema 5-HT, se ha informado en pacientes con dolor crónico. El sistema 5-HT representa un poderoso sistema que puede disminuir y/o aumentar la magnitud del dolor después de una estimulación nociva.

6.6.1.2. Efecto analgésico de los fármacos antidepresivos

En la actualidad existe suficiente evidencia para reconocer el efecto analgésico propio de los antidepresivos. Los antidepresivos suprimen el dolor por diversos mecanismos y son considerados como un componente clave en el desarrollo

¹⁰⁶ K. Bannister, R. Patel, L. Goncalves. *Pain*. **2015**. 156, 1803-1811.

¹⁰⁷ K. Bannister, A.H Dickenson. *Curr Opin Support Palliat Care*. **2016**. 10(2), 143-148.

¹⁰⁸ H. Fields. *Pain*. New York: McGraw Hill. **1987**.

¹⁰⁹ H. Fields. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*. **1991**. 4(1), 83-92.

¹¹⁰ M. Osterweis, A. Kleinman, D. Mechanic. *Pain and Disability: Clinical, Behavioral and Public Policy Perspectives*. Washington, DC: National Academy Press. **1987**.

¹¹¹ N.E Rosenthal, C.M Mazzanti, R.L Barnett. *Mol Psychiatry*. **1998**. 3(2), 175-177.

¹¹² C.A Lowry, S.L Lightman, D.J Nutt. *J Psychopharmacol*. **2009**. 23, (4), 392-400.

¹¹³ M.J Millan. *Semin Neurol*. **1995**. 7(6), 409-419.

¹¹⁴ M.J Millan. *Pain*. **1994**. 58(1), 45-61.

de estrategias terapéuticas para el tratamiento de diversos tipos de dolor persistente¹¹⁵.

El dolor crónico no puede ser aliviado adecuadamente con la administración de medicamentos con acción antiinflamatoria no esteroideos u otros analgésicos simples. Por este motivo actualmente se usan tratamientos con antidepresivos como adyuvante para el control del dolor persistente. Este mismo se practica actualmente en trastornos como la fibromialgia, el dolor neuropático, afecciones reumatoides, dolor lumbar y dolor de cabeza.

Aunque la actividad antidepresiva puede ser responsable de generar una respuesta analgésica, existe evidencia que indica que estos dos efectos son independientes entre sí. Por ejemplo, se ha informado que existe una respuesta analgésica en pacientes no deprimidos^{116,117} y que los efectos analgésicos ocurren antes y con dosis más bajas que los efectos antidepresivos¹¹⁸.

6.6.2. (SerH₂)₂[CuCl₄]

Existe en la literatura vasta evidencia de que los compuestos antidepresivos actúan también como analgésicos, incluso teniendo efectos independientes¹¹⁹ entre sí. Éste comportamiento se ha demostrado tanto en estudios clínicos, así como en animales sometidos a diferentes estímulos nociceptivos¹²⁰. Entre ellos, se han reportado complejos conteniendo Cu(II) con efecto analgésico¹²¹. Por estos antecedentes en la literatura, es que se considera la posibilidad de que la administración combinada de la sertralina y el cobre en la forma del compuesto (SerH₂)₂[CuCl₄] posean actividad antinociceptiva. Debido a la escasa información sobre el efecto analgésico de la sertralina, incluimos este producto farmacéutico también en nuestros estudios.

Los resultados de los estudios realizados se muestran en la Figura 13. Tanto en el tratamiento agudo (60 minutos) como en el crónico (14 días) se ve un incremento en el tiempo de latencia comparado con el basal (solución salina) y este tiempo es proporcional con el efecto analgésico de los compuestos testeados. Durante el tratamiento agudo se pudo apreciar que los animales incrementaron el tiempo en que tardan en responder al estímulo térmico, lamiendo sus extremidades de un 30,36 % a un 40 % para sertralina (10,0 mg/Kg) y CuCl₂ (2,7 mg/Kg) respectivamente. Al contrario, en el tratamiento crónico con iguales dosis los compuestos fallaron para incrementar el tiempo de latencia.

¹¹⁵ J Sawnyok, M.J Esser, A.R Reid. *J Psychiatry Neurosci.* **2001.** 26, 21-29.

¹¹⁶ G. Leijon, J. Bovi. *Pain.* **1989.** 36, 27-36.

¹¹⁷ Y. Sharav, E. Singer, E. Schmidt, A. Dionner, R. Dubner. *Pain.* **1987.** 31, 199-209.

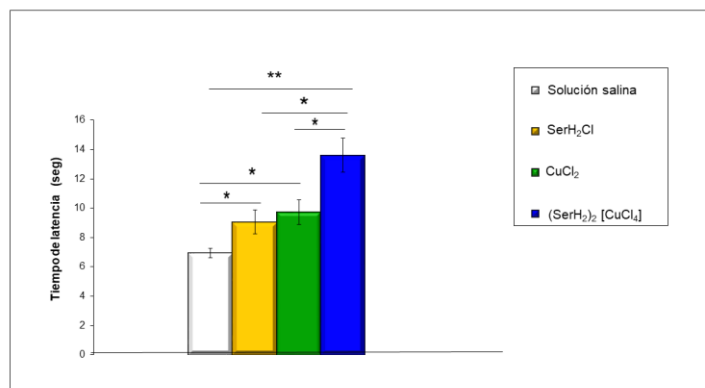
¹¹⁸ J. Davis, S. Lewis, J. Gerich, R. Kaplan, T. Schultz, J. Wallin. *JAMA.* **1977.** 238, 2291-2292.

¹¹⁹ R. Rodrigues-Filho, R.N Takahashi. *Int J Neuropsychopharmacol.* **1999.** 2, 263-269.

¹²⁰ I. Korzeniewska-Rybicka, A. Plaznik. *Pharmacol Biochem Behav.* **1998.** 59, 331-338.

¹²¹ Y.E Sherif, M.A Gouda, A.A El-Asmy. *Med Chem Res.* **2015.** 24, 3853-3862.

(A)



(B)

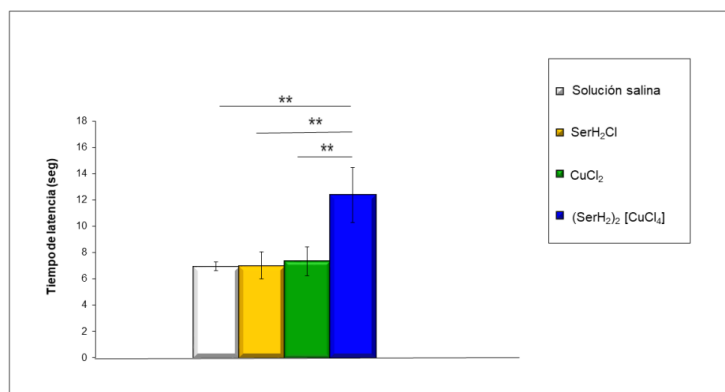
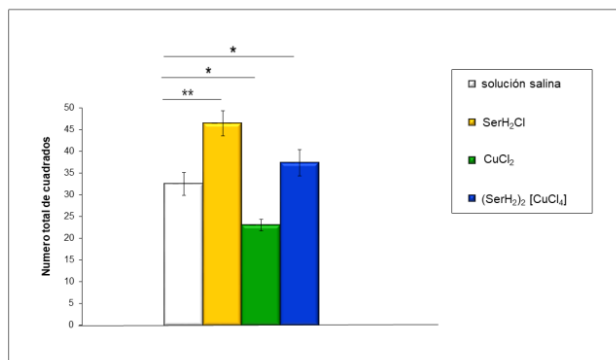


Figura 13. Prueba de la Placa caliente (PPC): Efecto del CuCl₂ (2,7 mg/Kg), SerH₂Cl (sertralina, 10,0 mg/Kg) y (SerH₂)₂[CuCl₄] (13,30 mg/Kg) en el tiempo de reacción de las ratas (lamida de las patas traseras). **(A)** tratamiento agudo y **(B)** tratamiento crónico.

El resultado obtenido para el tratamiento agudo con (SerH₂)₂[CuCl₄] (efecto analgésico) es mucho mayor (95,82%) en comparación con la sertralina y CuCl₂.2H₂O cuando se determinan en forma independiente. Adicionalmente, en el tratamiento crónico el nuevo compuesto mantiene su efecto a diferencia de los otros compuestos probados. El tiempo de latencia se incrementa al 76,69% comparado con los controles. Este es un claro indicio de que la acción analgésica del complejo (SerH₂)₂[CuCl₄] se encuentra potenciada dado que tanto la sertralina como el cobre no producen efectos similares en las mismas condiciones experimentales. Se sugiere entonces que este efecto analgésico sostenido pueda deberse probablemente al hecho de que la absorción gástrica es lenta y prolongada¹²² y esto podría explicarse porque hay una mayor lipofiliidad. En el caso del complejo, se encontró que posee una mejor afinidad a la albúmina *per se* y esto favorecería su distribución biológica (sección 5, Biodisponibilidad). También se ha propuesto que el aumento de la actividad analgésica de los complejos de cobre puede explicarse por la activación de receptores opioides dependientes de cobre²². También en este caso se analiza la actividad locomotora (prueba de campo abierto (PCA)) para los dos tipos de tratamiento (Figura 14).

¹²² S. Okuyama, S. Hashimoto, H. Aihara, W.M. Willingham, J.R. Sorenson. *Agents Actions*. **1987**. 21, 130-144.

(A) Actividad Locomotora para el tratamiento agudo (60 min).



(B) Actividad Locomotora para el tratamiento crónico (14 días).

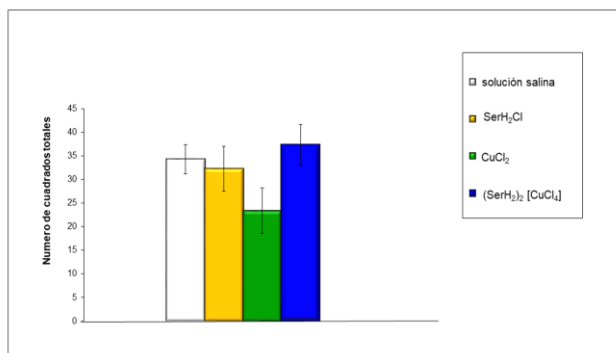


Figura 14. Efectos de los tratamientos con SerH₂Cl, CuCl₂ y (SerH₂)₂[CuCl₄] sobre los comportamientos en la prueba de campo abierto (PCA). Los resultados se expresan de acuerdo al número medio de recuentos durante el período de 5 minutos de la prueba (\pm S.E.M). *P < 0,05, **P < 0,01, 5-10 ratas/ grupo. Solución salina; CuCl₂ (2,70 mg/Kg) SerH₂Cl (10,0 mg/Kg) y (SerH₂)₂ [CuCl₄] (13,3 mg/Kg). Los datos se analizaron con ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

En el caso de la actividad locomotora para el tratamiento agudo cuando se administra (SerH₂)₂[CuCl₄] se ve que la misma se incrementa respecto al tratamiento realizado con CuCl₂·2H₂O donde disminuye. Estas dos observaciones no se repiten durante el tratamiento crónico ya que ninguno de estos compuestos afecta la actividad locomotora en la prueba de campo abierto.

Estos resultados sugieren, como es el caso de otros compuestos, que la actividad analgésica es totalmente independiente de la actividad antidepresiva.

Además en el caso del tratamiento agudo el aumento de la actividad locomotora sugiere que el compuesto no actúa como un sedante, mientras que en el tratamiento crónico los niveles de actividad fueron los esperados¹²³.

¹²³ G.E Escudero, C.B Romañuk, M.E Toledo, M.E Olivera, R.H Manzo, C.H Laino. *J Pharm Pharmacol.* **2015.** 67, 1251-1262.

Se realizaron también los controles respectivos en las variaciones de peso corporal (Figura 15).

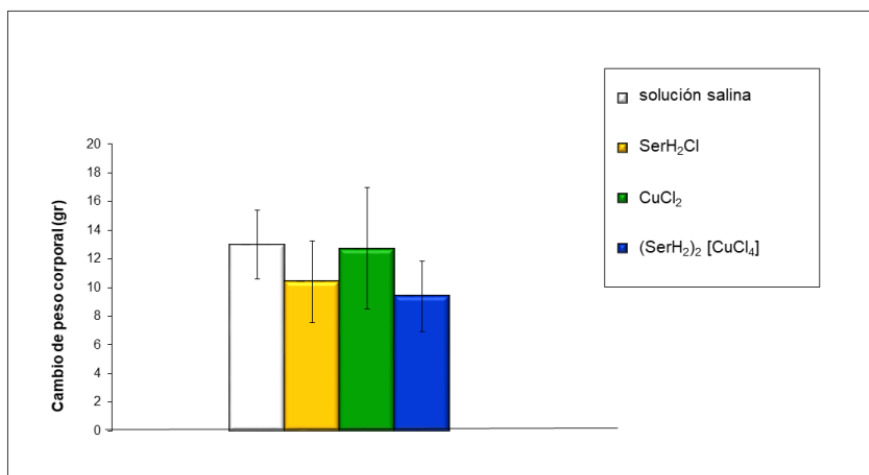


Figura 15. Efecto de los tratamientos de SerH₂Cl, CuCl₂ y (SerH₂)₂[CuCl₄] sobre el peso corporal. Los resultados se expresan en media \pm S.E.M., ** P < 0,01, 5-10 ratas/grupo. Solución salina; CuCl₂ (2,70 mg/Kg) SerH₂Cl (10,0 mg/Kg) and (SerH₂)₂[CuCl₄] (13,3 mg/Kg). Los datos se analizaron con ANOVA, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Como se observa, ninguno de los compuestos afecta la ganancia de peso comparado con los controles realizados. Este resultado es una gran ventaja ya que los compuestos analgésicos tradicionales provocan pérdida de peso.

6.6.3. Actividad analgésica. Derivados de Mg(II) y ácido DL-pGlu. Prueba de la platina caliente

En relación al mecanismo antinociceptivo del Mg(II) es conocido que el receptor de la NMDA cumple un papel importante en el dolor persistente¹²⁴ y en la generación y mantenimiento de la hipersensibilidad espinal que terminan desencadenando dolor crónico¹²⁵. El efecto analgésico ocasionado por el magnesio es debido a que puede bloquear al receptor NMDA en la médula espinal. Estudios realizados han enfatizado los efectos antinociceptivos del magnesio, en modelos experimentales de dolor neuropático¹²⁶ en tratamientos mediante administración intratecal con el metal y en la prueba de formalina^{127,128}.

¹²⁴ T.J Coderre. Excitatory amino acid antagonists: potential analgesics for persistent pain, Novel Aspects of Pain Management: Opioids and Beyond. Edited by Sawynok J, Cowan A. New York, Wiley-Liss. **1999**. 157-178.

¹²⁵ Dickenson AH. Mechanisms of central hypersensitivity: Excitatory amino acid mechanisms and their control, Textbook of Pain, 3rd edition. Edited by Wall PD, Melzack R. Edinburgh, Churchill Livingstone. **1994**. 167-210.

¹²⁶ L. Nowack, P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet, A. Prochiantz. *Nature*. **1984**. 307, 462-465.

¹²⁷ W.H Xiao, G.J Bennett. *Brain Res*. **1994**. 666, 168-172.

¹²⁸ K. Ishizaki, M. Sasaki, S. Karasawa, H. Obata, T. Nara, F. Goto. *Anaesthesia*. **1999**. 54, 241-246.

Como nos referimos anteriormente se han hallado algunos compuestos que pueden tener un rol beneficioso. Así por ejemplo, la administración de cloruro de magnesio (dosis de 90 mg/Kg) antes de la inducción de artritis en ratas Wistar, evita la hipernocicepción inducida por carragenina¹²⁹. Además, también se demostró la eficacia para disminuir los dolores de los pacientes que sufren osteoartritis cuando se añade fluoruro de magnesio en la medicación habitual¹³⁰. Existen también datos de pacientes que se sometieron a una cirugía artroscópica de rodilla y que recibieron sulfato de magnesio intra-articular (50 mg/mL) y que tuvieron como resultado una reducción significativa del dolor¹³¹. Por otro lado cuando, se administró una mezcla de anestésico local y magnesio, en su forma $MgSO_4$ como adyuvante, para el bloqueo del dolor, proporcionó una excelente tolerabilidad y satisfacción del paciente, asegurando un mejor efecto analgésico postoperatorio y otorgó protección extra a los pacientes frente a los efectos secundarios indeseados relacionados con los opioides¹³².

En relación al compuesto que se estudia en este trabajo, la administración oral de pidolato de magnesio pudo reducir la aparición de dolores diarios en pacientes con la enfermedad de células falciformes¹³³.

Sobre la base de esta información previa se determinó la actividad antinociceptiva de los compuestos. Debe tenerse en cuenta que un aumento en el tiempo de reacción (latencia, seg.) cuando este valor es comparado con el tiempo del basal (solución salina), es proporcional a la actividad analgésica de los compuestos probados. Se puede apreciar (Figura 16) que los tratamientos con $MgCl_2$ y ácido DL-pGlu no alteraron significativamente el tiempo de reacción en las dos dosis empleadas en el presente estudio.

¹²⁹ A.L Cavalcante, R.M Siqueira, J.C Araujo, D.V Gondim, R.A Ribeiro, J.S Quetz, A. Havt, A.A Lima, M.L Vale. *Eur J Oral Sci.* **2013**. 121, 573-583.

¹³⁰ A. Fioravanti, S. Tenti, C. Giannitti, N.A Fortunati, M. Galeazzi. *Int J Biometeorol.* **2014**. 58, 79-86.

¹³¹ R.S Bondok, A.M Abd El-Hady. *Br J Anaesth.* **2006**. 97, 389-392.

¹³² A.R Lee, H.W Yi, I.S Chung, J.S Ko, H.J Ahn, M.S Gwak. *Can J Anaesth.* **2012**. 59(1), 21-27.

¹³³ L. De Franceschi, D. Bachir, F. Galacteros, G. Tchernia, T. Cynober, D. Neuberg, Y. Beuzard, C. Brugnara. *Br J Haem.* **2000**. 108, 284-289.

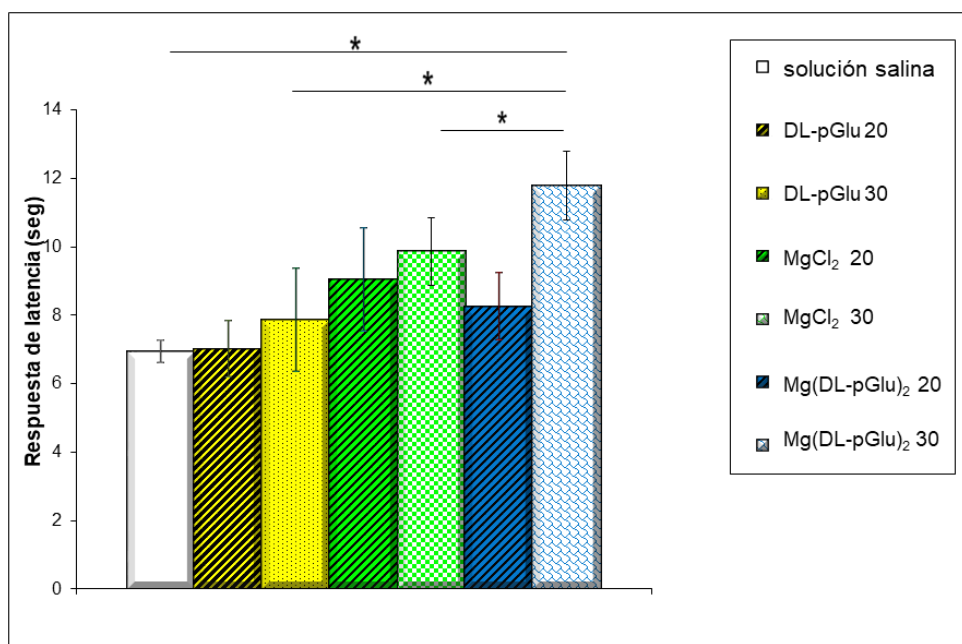


Figura 16. Efecto analgésico de Mg(DL-pGlu)₂, MgCl₂ y ácido DL-pGlu en la prueba de la platina caliente. Las dosis para Mg(DL-pGlu)₂ y MgCl₂ fueron de 20 y 30 mg(Mg)/Kg. En el caso del ácido DL-pGlu los valores de 20 y 30 están referidos a las dosis proporcionales que son usados en el complejo metálico considerando 20 y 30 mg(Mg)/Kg.

Los valores se expresan como la media \pm SEM para grupos de animales de 6-10 ratas. *p < 0.05. Los datos son analizados con ANOVA de una vía, seguido por el método de las comparaciones múltiples de Tukey.

Curiosamente, el tratamiento con Mg(DL-pGlu)₂ tuvo un mayor efecto antinociceptivo. La latencia de respuesta aumentó a 70,0% en comparación con el control. Estos hallazgos evidencian una acción analgésica significativamente potenciada.

Desafortunadamente, no se pudo realizar una comparación directa con otros compuestos de magnesio debido a la novedad de este tipo de estudios que utilizan complejos metálicos de magnesio.

6.7. Conclusiones

En este capítulo se estudiaron *in vivo* los efectos antidepresivos, anorexigénicos y analgésicos de los complejos (SerH₂)₂[CuCl₄] y [Mg(DL-pGlu)₂].

Para el complejo de cobre/sertralina se encontró un efecto antidepresivo dosis dependiente más efectivo que el de sertralina por lo que se menciona una sinergia entre el ligando y el complejo tetraclorocuprato(II). Se conoce que el suministro crónico de sertralina produce efectos anorexigénicos, mientras que en el compuesto de cobre quedó demostrado que este efecto se suprime.

Tanto en los tratamientos agudo como crónico se observó efecto analgésico.

En el tratamiento agudo el tiempo de latencia aumenta para sertralina y Cu(II) siendo mayor en el complejo y en el crónico sólo el complejo aumenta el efecto analgésico.

El complejo de Mg con el piroglutamato mostró actividad antidepresiva a las dosis más altas probadas, descartando un efecto sinérgico, dado que ni el metal ni el ligando mostraron dicho efecto. Asimismo, tampoco se modificó el peso corporal de las ratas. En cuanto a la actividad analgésica, se encontró que presenta un efecto antinociceptivo mayor que el MgCl_2 también a las dosis más altas probadas.

CAPÍTULO 7

Materiales y métodos.

Capítulo 7. Materiales y métodos

7.1. Caracterización fisicoquímica:

7.1.1. Análisis elemental:

Para el análisis elemental de C, H, N, O y S se usó un analizador Carlo Erba EA 1108, que pertenece al Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía, INQUIMAE. En este equipo se produce la combustión de la muestra en un tubo reactor donde es transformada a CO₂, H₂O y N₂. La separación de los gases se realiza por cromatografía gaseosa con columna de porapac de longitud variable y para la detección se utiliza un detector de conductividad térmica. El método requiere una calibración previa con una sustancia de composición conocida. En este caso se usaron dos patrones, uno de BBOT (2,5-bis(5-tert-butil-benzoxazol-2-il)tiofeno) y el otro de ácido sulfanílico.

7.1.2. Análisis termogravimétrico (TGA) y térmico diferencial (DTA)

El análisis termogravimétrico y el análisis térmico diferencial se realizó mediante el empleo de un sistema termoanalítico Shimadzu (Kyoto, Japón) modelos TG-50 y DTA-50. Se trabajó en atmósfera de O₂ con un flujo de 50 ml/min y una velocidad de calentamiento de 10°C/min. El rango de muestra utilizado fue entre 10 y 20 mg. Se empleó Al₂O₃ como estándar para el DTA. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa TASYs. Para el complejo de Mg(II), sólo pudo realizarse el TG en atmósfera de aire.

7.1.3. Determinación de estructuras cristalinas

Las medidas fueron realizadas mediante un difractómetro Oxford Xcalibur Gemini, Eos CCD empleando radiación de MoK α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) y CuK α ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) reflejada en un monocromador de grafito. Las intensidades de la difracción por rayos-X fueron colectadas (barridos en ω con ángulos Θ y κ dados), integradas colocadas en una misma escala mediante el conjunto de programas CrysAlisPro¹.

Los parámetros de la celda unidad fueron obtenidos mediante refinamiento de cuadrados mínimos (basado en las posiciones angulares de todas las reflexiones colectadas con intensidades superiores a siete veces la desviación estándar de los errores de medición) usando CrysAlisPro.

Los datos fueron corregidos empíricamente por efectos de absorción empleando el método de múltiple-barrido implementado en CrysAlisPro. La estructura fue resuelta por

¹ CrysAlisPro, Oxford Diffraction Ltd., version 1.171.33.48 (release 15-09-2009 CrysAlis171.NET).

métodos directos con SHELXS-97 del paquete de programas SHELX² y los modelos moleculares correspondientes fueron desarrollados por ciclos alternados de métodos de Fourier y refinamiento por cuadrados mínimos de matriz completa con SHELXL-97 del mismo paquete de programas.

7.1.3.1. Análisis de superficie Hirshfeld (HSs)

El análisis de superficie de Hirshfeld (HS) se realizó utilizando³ el software Crystal Explorer 3.1, el cual está basado en estudios de difracción de rayos X. La función d_{norm} es una relación que incluye las distancias de cualquier punto de la superficie más cercana, tanto interior (d_i) como exterior (d_e) del átomo y los radios de van der Waals de los átomos. Cuando la función d_{norm} tiene un valor negativo, indica que la suma de las distancias d_i y d_e es menor que la suma de los radios de van der Waals más relevantes y se considera el contacto más cercano. En el mapeado de HSs, el contacto más cercano aparece en rojo, las distancias intermoleculares (cerca de los contactos de van der Waals con $d_{\text{norm}} = 0$) en color blanco y, los contactos que son mayores que la suma de los radios de van der Waals (valores positivos de d_{norm}) son de color azul. La presencia de diferentes tipos de interacciones intermoleculares se puede observar en un gráfico de huellas digitales 2D de d_i versus d_e .

7.1.4. Espectros infrarrojos (FTIR)

Los espectros infrarrojo de las distintas muestras sólidas fueron medidos en un espectrofotómetro FTIR Bruker (Alemania) IFS 66 desde 4000 a 400 cm^{-1} bajo la forma de pastillas de KBr. La resolución espectral fue de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ y se ha hecho por espectro un total de 64 escaneos. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa OPUS (Bruker Optics, USA).

7.1.4.1. Simulación de espectros infrarrojos mediante métodos computacionales para $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MgDMA)

Los cálculos computacionales se realizaron utilizando los valores experimentales del espectro de difracción de rayos X a partir del cual se obtuvieron los valores de los parámetros cristalográficos de $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Las estructuras del complejo se optimizaron con métodos de minimización del gradiente para encontrar la geometría que minimice la energía. El análisis vibracional para el complejo de magnesio se efectuó con el objetivo de obtener el valor más bajo de la energía en la superficie de energía potencial. Los cálculos se realizaron con las herramientas de Teoría Funcional de Densidad implementadas en el paquete de programas de GAUSSIAN 09⁴, utilizando el

² G.M Sheldrick. *Acta Crystallogr.* **2008**. 64, 112-122.

³ S.K Wolff, D.J Grimwood, J.J McKinnon, M.J Turner, D. Jayatilaka, M.A Spackman, CrystalExplorer 3.1 (2013), University of Western Australia, Crawley, Western Australia, (2005-2013), <http://hirshfeldsurface.net/CrystalExplorer>.

⁴ M.J Frisch, G.W Trucks, H.B Schlegel et al. **2010**. Gaussian-09. Gaussian Inc. Wallingford.

funcional híbrido con intercambio no local debido a Becke⁵ y el funcional de correlación debido a Lee, Yang y Parr⁶, método conocido como B3LYP.

En el presente trabajo se utilizaron conjuntos de bases gaussianas contraídas de calidad triple zeta más funciones polarizadas y difusas 6-311++g (2d,p)⁷ para todos los átomos.

El análisis vibracional correspondiente se realizó para verificar que la geometría optimizada no corresponda a un punto local mínimo o de silla de montar en la superficie de energía potencial de la molécula, sino a un mínimo global. Los cálculos también se llevaron a cabo con el paquete de programas de Gaussian 09. Los modos normales calculados también se utilizaron como ayuda en la asignación de frecuencias experimentales.

Los espectros electrónicos de los compuestos se calcularon utilizando la teoría funcional de la densidad dependiente del tiempo⁸ tal como está implementado en el paquete Gaussian 09. Las energías de la transición electrónica vertical se calcularon en la geometría del estado fundamental optimizada utilizando el método PBE0 meta-híbrida⁹ para generar un número de 80 transiciones de singlete a singlete. Los efectos de solvente (agua) también se incluyeron en el mismo nivel de teoría utilizando el Modelo de continuo polarizable¹⁰.

7.1.5. Espectros Raman

Los espectros Raman fueron medidos mediante un equipo Raman Horiba Jobin Yvon T64000 con microscopio confocal Olympus BX41 en una muestra policristalina empleando la línea de 514,5 nm del láser de Ar, una potencia de 400 mW con un tiempo de adquisición de 10 s y 10 acumulaciones, y en el rango de 4000 a 400 cm⁻¹.

El ploteo, procesamiento de datos, normalizaciones y evaluaciones de los espectros se llevaron a cabo mediante el software OPUS software (Bruker Optics, Germany).

7.1.6. Espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR)

Para la muestra de (SerH₂)₂[CuCl₄], se utilizó un espectrofotómetro Bruker ESP300 que opera en banda X (frecuencia=9,5GHz, 3400 Gauss) y banda Q (frecuencia=35GHz, 12500 Gauss) y que está equipado con un accesorio estándar de baja temperatura (Oxford, ESR900/ITC4). La ventaja del uso de la banda Q es la mejor resolución de sistemas con valores de tensores g similares, la reducción de los efectos de segundo orden en las interacciones hiperfinas, y la observación de transiciones prohibidas, entre otras. Se obtuvo la simulación computarizada de los espectros EPR mediante el

⁵ A.D Becke. *Phys Rev A*. **1988**. 38, 3098-3100.

⁶ R.G Parr. *Quantiques/International Academy of Quantum Molecular Science*, Ed. Springer, Vol 3. Dordrecht. **1980**.

⁷ M.J Frisch, J.A Pople, J.S Binkley. *J Chem Phys*. **1984**. 80, 3265-3269.

⁸ K. Wolinski, J.F Hinton, P. Pulay. *J Am Chem Soc*. **1990**. 112(23), 8251-8260.

⁹ M.E Casida, C. Jamorski, K.C Casida, D.R Salahub. *J Chem Phys*. **1998**. 108, 4439-4449

¹⁰ V. Barone, M. Cossi. *J Phys Chem A*. **1998**. 102(11), 1995-2001.

programa Simfonia (WINEPR Simfonia v 1,25 , Bruker Analytische Messtechnik GmbH, 1996).

Las muestras de los complejos de Cu(II) con los derivados de metimidazol fueron obtenidas en banda X a temperatura ambiente y a 120K en un espectrómetro Bruker EMX-Plus equipado con una cavidad rectangular de una modulación de 100 kHz para el campo magnético. Los espectros en solución se realizaron en DMSO. La simulación de los datos experimentales se realizó utilizando el programa EasySpin con base de MATLAB¹¹.

7.1.7. Espectros de Reflectancia Difusa

Los espectros de reflectancia difusa UV-vis fueron registrados en un espectrofotómetro Shimadzu UV-300 utilizando el accesorio correspondiente y MgO como estándar.

7.1.8. Espectros electrónicos (UV-vis)

Las medidas espectrales se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-vis de simple haz Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, Estados Unidos) 8453 con arreglo de diodos, para adquirir los espectros se utilizó un software desarrollado por la Universidad de Cornell.

También se utilizó, principalmente para medidas a longitud de onda fija, el espectrofotómetro UV-vis de doble haz Shimadzu UV-300, con monocromador. Para ambos equipos se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

7.2. Estudios en solución

7.2.1. Estudios de estabilidad en solución

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos en solución para su uso en ensayos biológicos *in vitro* e *in vivo*, se disolvieron los compuestos en el solvente adecuado y se mantuvieron a 25 °C. El estudio se llevó a cabo registrando la variación del máximo de absorbancia del espectro UV-vis en el tiempo.

7.2.2. Titulación espectrofotométrica.

La estequiometría de los sistemas estudiados en solución se establece mediante el método de la razón molar. La titulación espectrofotométrica se realiza mediante el registro de los cambios de absorbancia de los espectros electrónicos de los compuestos en función de la relación Ligando/Metal (L/M) a un valor constante de longitud de onda.

¹¹ S. Stoll, A. Schweiger. *J Magn Reson.* **2006.** 178, 42-55.

Para obtener los espectros se usa una solución del ligando en estudio (en el solvente adecuado y al pH de síntesis) con el agregado de una solución del cloruro del metal cubriendo un rango de relaciones L/M desde 10/1 hasta 0,5/1, bajo atmósfera de nitrógeno.

Las medidas espectrales se realizan utilizando un espectrofotómetros UV-visible (Hewlett-Packard HP 8453 y Agilent Technologies Cary 60) empleando celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

7.3. Medidas de actividades Biológicas *in vitro*

7.3.1. Actividad antitiroidea

7.3.1.1. Determinación de la formación de complejo de transferencia de carga con iodo para relaciones molares 1:1.

El iodo utilizado fue provisto por Merck, el mismo fue bisublimado y se mantuvo en oscuridad en un desecador que contiene P₂O₅. Los disolventes utilizados fueron N,N-dimetilformamida, etanol y metanol. Las soluciones de iodo, ligandos y complejos se prepararon siempre antes del comienzo de la experimentación. Las soluciones madre de iodo siempre se disolvieron en etanol mientras que los compuestos se disolvieron en N,N-dimetilformamida y metanol.

El ensayo consiste en registrar los espectros de una mezcla de volúmenes iguales de las soluciones de iodo y complejo en una celda espectrofotométrica de 1,5 ml termostatzada a 25°C.

La concentración de la solución de iodo se mantuvo constante durante todo el ensayo y se fueron variando la concentración de la solución de complejo.

El experimento se realiza de forma independiente y por triplicado.

El objetivo del experimento es hallar la constante de formación, si existiese interacción del tipo de transferencia de carga (TC), entre la especie en estudio y el iodo. Es por ello que para poder determinar esta interacción se usa el Método de Lang¹². Este método permite hallar una K_c de formación y el coeficiente de extinción molar (ε) para aquellos complejos de transferencia de carga formados en una relación estequiométrica 1:1 bajo la longitud de onda en análisis:

$$[A_0][D_0]/d_c = ([A_0]+[D_0]- d_c/\epsilon_c) / \epsilon_c + 1/(K_c \epsilon_c) \quad (1)$$

En donde A₀ y D₀ son las concentraciones iniciales del aceptor (iodo) y el donador (compuesto en estudio) respectivamente; la d_c representa la absorbancia, ε_c es el coeficiente de extinción molar y K_c es la constante de formación del complejo de

¹² Z. Zhang, C. Bi, S.M Schmitt, Y. Fan, L. Dong, J. Zuo, Q. Ping Dou. *J Biol Inorg Chem.* **2012.** 17, 1257-1267.

transferencia de carga. Los parámetros se ajustaron con un programa diseñado por nuestro grupo de investigación.

La ecuación (1) se puede re-escribir de la siguiente forma.

$$Y = (1/\epsilon_c)X + 1/(K_c\epsilon_c) \quad (2)$$

Donde $Y = [A_0][D_0]/d_c$ y $X = [A_0] + [D_0] - d_c/\epsilon_c$.

A partir de la ecuación (2) se obtiene la gráfica de una recta con pendiente $1/\epsilon_c$ y ordenada al origen de $1/(K_c\epsilon_c)$. Para resolver esta ecuación se utiliza un método de iteración y de regresión lineal.

7.3.1.2. Determinación de la K_c para relaciones estequiométricas superiores a 1:1

La reacción se llevó a cabo directamente en la celda espectrofotométrica mezclando soluciones de 1,5 ml del agente donador a diferentes concentraciones y del aceptor (iodo). Los espectros se registraron inmediatamente en un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz. La temperatura de las soluciones se mantuvo a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante las mediciones. Se midieron tres réplicas independientes de cada solución.

Cuando las concentraciones experimentales del agente donador son superiores a las del aceptor, la fórmula utilizada para poder determinar la constante de formación (K_{CT}) y el coeficiente de extinción molar (ϵ) del complejo, es la ecuación modificada de Benesi-Hildebrand para relaciones molares 1:1¹³, es la siguiente:

$$[D_0]_x[A_0]_x/l/A = 1/K_C + [D_0] + [A_0]/\epsilon \quad (3),$$

donde A_0 y D_0 son las concentraciones iniciales del aceptor y el donador, respectivamente. Mientras que A es la absorbancia de las bandas de transferencia de carga, y l es la longitud del camino óptico de la celda (1 cm).

Con la finalidad de poder calcular el valor de K_C y de ϵ , se grafican los valores obtenidos a partir de la ecuación (3): $[D_0]_x[A_0]$ vs $[D_0] + [A_0]/\epsilon$. De la recta de la curva se obtienen los valores de la pendiente $1/\epsilon$ y de la ordenada al origen $1/K_C$.

Para determinar los parámetros termodinámicos, el cambio de energía libre ΔG^0 se calculó a partir de la energía de formación libre de Gibbs de acuerdo con la ecuación:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_C$$

¹³ H.H Eldaroti, S.A Gadir, M.S Refat, A.M.A Adam. *J Pharm Anal.* **2014.** 4(2), 81-95.

donde ΔG^0 es el cambio de energía libre del complejo de TC, R es la constante universal de los gases (8,31 J/K x mol), T es la temperatura en Kelvin y K_C es la constante de formación del complejo donante-aceptor.

La energía del complejo de transferencia de carga se asumió como $E_{TC} = (h\nu_{TC}) = 1243,667/\lambda_{TC}$ (nm)(eV), donde λ_{TC} es la longitud de onda de la banda de complejación¹³.

7.3.2. Capacidad de inhibición de la enzima lactoperoxidasa (LPO)

Para determinar el efecto inhibitorio de los compuestos en estudio sobre la actividad enzimática de la lactoperoxidasa bovina (LPO), se utiliza una técnica espectrofotométrica basada en la determinación del producto de la oxidación del ABTS a 411 nm. En los ensayos se incubó la mezcla de reacción en buffer fosfato pH 6 a 25 °C, se usó una concentración de enzima LPO bovina (0,15-0,25 unidades mL⁻¹), 100 mM de ABTS y 28,7 mM de agua oxigenada (a 30% w/w).

La reacción se inicia cuando se añade el sustrato ABTS a 1 mL de mezcla de reacción, previamente termostatizado, con concentraciones finales de 12,9 nM LPO, 28,7 mM H₂O₂, 1,4 mM ABTS, 1-100 mM del inhibidor a testear. Los complejos se disolvieron en DMSO antes de agregarle buffer para obtener las concentraciones finales deseadas (% DMSO en la mezcla de reacción < 0,5 %). El efecto de cada concentración se testeó por triplicado en al menos tres experimentos independientes.

La actividad enzimática se expresa como el porcentaje observado en ausencia de inhibidores.

7.4. Determinación de actividades antioxidantes:

7.4.1. Actividad superóxido dismutasa (SOD) símil

Este es un método no enzimático¹⁴ que consiste en generar en la mezcla de reacción el anión superóxido (O₂⁻) por medio del sistema fenazina metosulfato (PMS)/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Esta reacción genera los radicales superóxido que reducen el nitroazul de tetrazolio (NBT) al azul de formasán.

La idea al evaluar la actividad antioxidante, es ver si los compuestos son capaces de secuestrar los radicales formados *in situ*. La reacción consiste en mezclar 500 µL de soluciones de NBT (300 µM), NADH (140 mM) y distintas concentraciones de complejo en buffer fosfato 0,1M (KH₂PO₄/NaOH pH 7,4). Se termostatiza a 25 °C durante 15 minutos.

El inicio de la reacción comienza con el agregado de 500 µL de una solución de PMS (120 µM). Al cabo de 5 minutos se mide la absorbancia a 560 nm y se comparan las lecturas con los basales. El basal consiste en una solución de NBT (300 µM), NADH (140 mM) y buffer fosfato 0,1M (KH₂PO₄/NaOH pH 7,4).

¹⁴ W.H Koppenol. *Free Radic Biol Med* . **1993**. 15(6), 645-51

Este experimento se hace de forma independiente al menos tres veces y luego se grafican los promedios SOD reducida respecto al basal en una curva de $-\log$ [concentración] de complejo antioxidante (moles/litro) versus el porcentaje de reducción del NBT respecto al basal. Con la ayuda del software Sigmaplot se ajusta una curva sigmoidea y de allí se calcula el IC_{50} (es la concentración de complejo que produce un 50% de inhibición en la formación de radicales).

7.4.2. Actividad antioxidante DPPH[•]

La actividad anti-radicalaria se mide en términos de la capacidad de los compuestos para eliminar los radicales DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo). Las mediciones se realizan empleando el método modificado de Yamaguchi y colaboradores¹⁵.

La técnica consiste en mezclar 500 μ L del compuesto objeto de estudio en distintas concentraciones (10-500 μ M) disuelto en buffer Tris-HCl (pH=7,4, 25 °C) con 2 mL de una solución metanólica de DPPH[•] (4 ppm), durante una hora en la oscuridad incubándolo a temperatura ambiente. Luego se mide en el espectrofotómetro a 517 nm.

La experiencia se repite al menos tres veces, y los resultados experimentales se grafican en una curva como concentración del compuesto versus el porcentaje DPPH reducido respecto al basal.

Como control, se utilizó ácido ascórbico, el cual al actuar como un antioxidante provoca una decoloración inmediata del color violeta al amarillo.

¹⁵ T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba, C. Terao. *J Biosci Biotechnol Biochem.* **1998**. 62, 1201-1204.

7.5. Inhibición y activación de la actividad fosfatasa

7.5.1. Determinación *in vitro* de la inhibición de la fosfatasa alcalina (FAL)

El método utilizado es espectrofotométrico. Como sustrato de la fosfatasa alcalina utilizamos un compuesto artificial: p-nitrofenilfosfato (p-NPP) que, al poseer un resto orgánico con un grupo fosfato unido, puede ser reconocido por la enzima. El sustrato al ser hidrolizado origina un producto, el p-nitrofenol que en solución alcalina absorbe a una longitud de onda de 405 nm ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)(Figura 1).

Se trabaja en buffer (55 mM de glicina + 0,55 mM MgCl_2 , pH= 10,4 y fuerza iónica KCl 1M a 37°C) y se mide el efecto inhibitorio de diferentes sustancias agregadas. Las condiciones experimentales para la medición de la actividad específica de la fosfatasa alcalina fueron los siguientes: 1 $\mu\text{g/mL}$ de FAL bovina intestinal y 5 mM de p-NPP fueron disueltos en buffer (glicina de 55 mM + 0,55 mM MgCl_2 pH = 10,4) incubados durante 10 minutos. Los efectos de los compuestos fueron determinados por la adición de diferentes concentraciones (1-100 μM) a cada uno para las mezclas pre-incubadas. Las soluciones de los complejos se prepararon en DMSO (% DMSO en la mezcla de reacción < 1,5 %) antes de agregar el buffer para obtener las concentraciones finales deseadas. El efecto de cada concentración se testeó por triplicado en al menos tres experimentos independientes. Se grafica el % de inhibición de FAL respecto a la concentración del compuesto utilizado¹⁶.

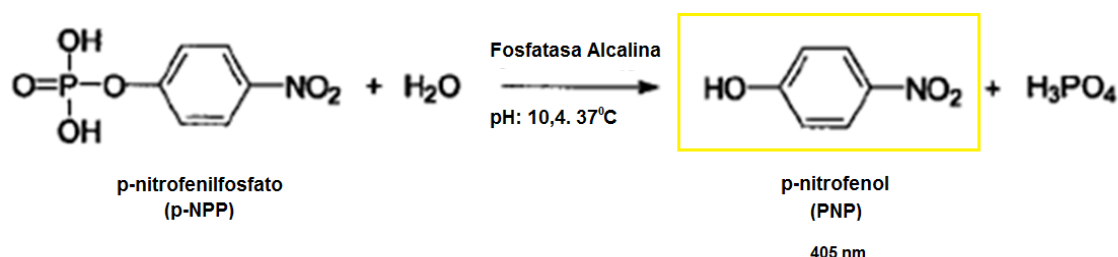


Figura 1. Reacción enzimática de la FAL.

7.5.2. Determinación *in vitro* de la inhibición de la fosfatasa ácida (FAC)

El ensayo para la prueba de inhibición de la fosfatasa ácida se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos por Blum Schwedt¹⁷ El buffer de acetato se preparó disolviendo un volumen de 5,72 mL de ácido acético concentrado en agua destilada (volumen final de 250 mL) ajustando el pH a 5,60 con 0,5 M NaOH. La solución madre de la enzima se realizó mezclando 12,5 mg del polvo de la fosfatasa ácida 0,25 U/mL en 2,0 mL del buffer acetato (la enzima usada es una fosfatasa ácida de papa, producto número P-3752, Sigma Chemical CoSt. Louis, MO). Para su uso, 100 μl de la solución

¹⁶ N. Urquiza, M.S.G Manca, M.A Moyano, R. Arrieta Dellmans, L. Lezama, T. Rojo, L.G Naso, P.A.M Williams, E.G Ferrer. *BioMetals*. **2010**. 23, 255-264.

¹⁷ U. Blum, G. Schwedt. *Anal Chim*. **1998**. 360, 101-108.

madre se diluyeron con 1,9 mL de tampón de acetato. Para la solución de sustrato de 0,170 g de p-NPP se disolvieron en 2,5 mL de agua destilada.

Procedimiento: Las soluciones de compuestos se prepararon por dilución de las soluciones madre preparadas en DMSO con buffer acetato. Un volumen de 0,50 mL de solución de compuesto se mezcló con 0,10 mL de la solución de enzima y 1,00 mL de buffer. La mezcla se mantuvo a 25 °C durante 20 min (tiempo de incubación). Después de iniciar la reacción mediante la adición de 0,10 mL de la solución de sustrato, el tubo se mantuvo a 25°C durante 20 min. La reacción se detuvo con la adición de 0,50 mL de una solución de hidróxido de sodio 0,5 M. La concentración final de DMSO resultó 1,14%. La actividad enzimática se calcula finalmente mediante la medición de la absorbancia del p-nitrofenol a 405 nm contra un blanco preparado sin la enzima. Se midieron tres repeticiones independientes de cada punto. El 100% de la actividad de la enzima se asigna a una medición basal que contiene todos los medios de reacción que incluyen el mismo volumen de DMSO en todos los experimentos. Se grafica el % de inhibición de FAc respecto a la concentración del compuesto utilizado.

7.5.3. Determinación *in vitro* de la activación de la fosfatasa alcalina

Para los ensayos de estimulación de la actividad enzimática de la FAL se procedió utilizando la técnica convencional para la determinación de la actividad enzimática (sección 7.5.1) realizando la medida de la cinética de la reacción y analizándola mediante el modelo de cinética enzimática de Michaelis-Menten.

Previamente a la determinación en sí, se realizan una serie de experimentos para analizar las mejores condiciones en donde se puede maximizar la reacción enzimática. Es por ello que fue primordial optimizar los diferentes parámetros (cantidades de sustrato y de enzima, y los tiempos de incubación). Estos ensayos previos nos permitieron determinar las condiciones para los ensayos experimentales.

La cinética se realizó variando solamente la concentración del sustrato p-NPP en el rango de 0,04 mM a 0,4 mM. Las mezclas de reacción se dejan pre-incubando durante 10 minutos a 37 °C conteniendo el buffer (pH = 10,4, sección 7.5.1) y el p-NPP (disuelto en buffer), más el ligando o el complejo metálico (ambos 5 mM). Luego de agregar FAL a una concentración de $6,25 \times 10^{-6}$ mM y realizar una incubación durante 5 minutos, se procedió a realizar las determinaciones espectrofotométricas.

Para poder seguir la conversión del sustrato p-nitrofenilfosfato (PNPP) a p-nitrofenol (PNP) se registró el espectro UV/Vis y se analizaron los cambios de absorbancia de la banda del producto localizada a 405 nm ($\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a lo largo del tiempo.

Los experimentos se realizaron por triplicado y fueron cinco set de experiencias diferentes.

Evaluación de los parámetros catalíticos.

Los resultados experimentales obtenidos fueron analizados mediante un tratamiento basado en el modelo Michaelis-Menten desarrollado para la cinética enzimática. Los valores de la constante de unión de Michaelis (K_m), la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y la

constante de velocidad para la disociación de sustratos k_{cat} , se calcularon a partir del gráfico de Lineweaver-Burk: $(1/V = (K_m/V_{max})(1/[S]) + 1/V_{max})$.

7.6. Actividad peroxidasa símil:

7.6.1. Bromación del rojo fenol

La reacción de bromación del rojo fenol, se realiza a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ manteniendo el pH en 5,8 (solución buffer de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$).

La mezcla de reacción contiene distintos volúmenes de soluciones de H_2O_2 30%, KBr (2M) en el buffer mencionado y distintas concentraciones de los compuestos en estudio. El inicio de la reacción ocurre por el agregado de 20 μM una solución rojo fenol a la mezcla de reacción y de forma inmediata se determina el espectro UV-vis a medida que transcurre el tiempo cada un minuto. En el transcurso del mismo se espera observar la aparición de una nueva banda localizada a 592 nm debido a la formación del azul de bromofenol y la desaparición de la banda localizada a 443 nm correspondiente al rojo fenol.

7.6.1.1. Oxidación catalítica de pirogalol

La actividad mimética se determina analizando la reacción de oxidación del pirogalol a purpuralina mediante espectrofotometría UV-vis. Se sigue la misma observando la aparición de la banda en el espectro UV-vis correspondiente a purpuralina a 420 nm ($\epsilon = 2640 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante un tiempo determinado midiendo el espectro cada un segundo. La reacción se llevó a cabo en buffer fosfato (1 M, pH 7).

En primera instancia etapa se optimizan diferentes parámetros (pH, cantidad de sustrato, catalizador) con el fin de hallar las mejores condiciones para maximizar la reacción de oxidación del pirogalol.

La cinética se realiza variando la concentración de pirogalol (0,038-0,5 mM) mientras se mantiene una concentración fija de H_2O_2 (0,25 mM) y el catalizador cuya concentración es seleccionada para cada experimento.

7.6.1.2. Análisis de datos

Los resultados experimentales de las determinaciones cinéticas pueden evaluarse de dos maneras:

- (i) Se obtienen considerando que la reacción sigue una cinética de pseudo primer orden. La dependencia del sustrato orgánico con el primer orden se da porque está demostrado que las curvas de $\ln([A]/[A_0])$ vs. tiempo son lineales, donde A y A_0 son las absorbancias a 592 nm, medidos en el tiempo t , $t \rightarrow \infty$, y $t = 0$, respectivamente. Las constantes de velocidad que surgen de la curva de reacción de pseudo primer orden varían linealmente en las condiciones experimentales.

- (ii) Se realizan en base al modelo de Michaelis-Menten (cinética enzimática). Los valores de la constante de unión de Michaelis (K_m), la velocidad máxima (V_{max}) y constante catalítica de la enzima (k_{cat}) se calcularon a partir del gráfico de Lineweaver-Burk como en la sección 7.5.3.

Se realizaron determinaciones por triplicado en todos los experimentos.

7.7. Actividad antimicrobiana

La actividad antibacterial y antifúngica del compuesto derivado de sertralina se evaluó mediante la determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC). Las MICs se determinaron usando el método de dilución con agar. Las cepas control incluyeron cinco cepas bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12238) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y siete cepas de *Candida*: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida albicans* (ATCC 10231, y aislados clínicos de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*. Para todas las cepas el medio de ensayo/cultivo que se utilizó fue un medio de cultivo universal: el caldo Mueller Hinton Agar (MHA) o Mueller Hinton Broth (MHB). El inóculo de las bacterias y hongos se preparó a partir de cultivos en caldo de 18 h de crecimiento. Se ajustó la turbidez de las suspensión de los microorganismos por comparación visual con un estándar de turbidez 0,5 de la escala de Mc Farland ($\sim 10^8$ unidades formadoras de colonias (CFU) por mL, CFU mL⁻¹).

Para el método de dilución en agar la suspensión de hongos ($\sim 10^8$ CFU por mL) se inoculó directamente sobre la superficie del agar, mientras que la suspensión bacteriana fue diluida 1:10 previo a la inoculación ($\sim 10^7$ CFU por mL) junto con el agente en estudio disuelto en el medio MH agarizado. Los compuestos fueron disueltos en una mezcla 50 % DMSO-agua hasta llegar a una concentración final 15 mg mL⁻¹. Todas las soluciones fueron esterilizadas por filtración antes de su uso.

Luego de las diluciones dobles seriadas a partir de la solución stock de los agentes antibacterianos, se adicionaron 0,5 mL de cada una de ellas en un tubo conteniendo 4,5 mL de agar MH estéril previamente fundido y mantenido a una temperatura de 50 °C, se agitaron las mismas con vortex, se vertieron en placas de Petri estériles de 45 milímetros de diámetro y se dejó solidificar el medio. El rango de concentración final de los mismos fue de 1,46 a 1500 µg mL⁻¹.

Para este ensayo se definieron como controles, placas de agar en donde se inocula a los microorganismos y DMSO sin el agregado de complejo. Posteriormente, se realizó un estriado en placa de 2 µL del inóculo de suspensiones microbianas y se incubó aeróbicamente a 37 °C durante 24h y 48h para bacterias y hongos, respectivamente.

La CIM se define como la dilución más baja del complejo ensayado que inhibió el crecimiento visible del organismo probado. Cada CIM se determinó por triplicado.

La inhibición del crecimiento bacteriano se determinó comprando las placas que contenían los compuestos con las placas control.

7.8. Medidas de actividades Biológicas *in vivo*

7.8.1. Actividad Antidepresiva. Animales: Tratamiento de los animales:

En el presente trabajo se emplearon como animales de experimentación, ratas macho adultas de la cepa Wistar (6-8 crías por madre), de la colonia cerrada del Bioterio de la Universidad Nacional de La Rioja, de 50-70 días de edad (200-310 g) al inicio de los experimentos.

Los animales son agrupados en cajas (en cajas de polietileno de 55 x 38 x 30 cm) de 5-7 en cada una y son provistas de libre acceso a comida y a agua durante todo el tratamiento. Las condiciones de mantención de los animales dentro del bioterio son con reciclado del aire, controlado mediante interruptor automático; la temperatura del bioterio se mantuvo en $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad promedio registrada fue de aproximadamente 45%. El ciclo de luz-oscuridad es de 12 horas (fotoperiodo de 8:00 h hasta la 20:00 h.)

Todos estos estudios fueron llevados a cabo de acuerdo las normas de la Guía de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio de la National Institutes of Health, USA y los protocolos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL-UNLAR) de la Universidad Nacional de La Rioja

7.8.2. Tratamiento farmacológico con antidepresivos

El tratamiento antidepresivo usado es crónico, este consiste en suministrar el antidepresivo una vez al día durante 14 días seguidos¹⁸.

7.8.3. Prueba de natación forzada (PNF ó Forced swim test (FST))

Los animales que se usaron en este experimento, son ratas Wistar Macho adultas. Se empleó un modelo de depresión aguda, la depresión se induce cuando a los animales se los fuerza a nadar por un determinado tiempo en un estanque de agua sin posibilidad de escapar. En esta prueba el chequeo de las drogas antidepresivas se realiza estableciendo cierta relación entre la eficacia clínica de la droga y la eficacia de reversión de algún síntoma en el modelo animal experimental, en el caso de la natación forzada el síntoma clínico de depresión que se quiere revertir es la inmovilidad del animal, que es un comportamiento de desesperanza del animal; Porsolt¹⁹ hipotetizó que la inmovilidad podría ser reducida con tratamientos utilizados para aliviar la depresión en los seres humanos.

¹⁸ J.F Cryan, R.J Valentino, I. Lucki. *Neurosci Biobehav* . **2005**. 29, 547-569.

¹⁹ R.D Porsolt. *Biomedicine*. **1979**. 30(3), 139-40.

Demostó que la inmovilidad era reducida mediante el uso de una gran variedad de agentes terapéuticos eficaces en pacientes depresivos

Se introducen de un animal dentro de un tanque cilíndrico de acrílico de (46 cm de alto y 20 cm de diámetro, que previamente se llenó con 30 cm de agua (23-25 °C)).

Se hacen dos sesiones de natación: uno es el Pre test (se realiza un día antes de iniciar el tratamiento) dura 15 minutos y otros es el test que dura 5 minutos y se hace al final del tratamiento (día 15).

Después de los 15 min del pre-test de natación forzada las ratas se retiraron del agua, se secaron con toallas, se colocaron en un lugar caliente durante 30 min, y subsiguientemente se regresaron a sus respectivas cajas. Posteriormente se iniciaron los tratamientos por 14 días. Veinticuatro horas después de finalizados los tratamientos, se realizó el test de natación durante 5 min en las mismas condiciones experimentales del pre-test. Durante estos 5 min se evaluó cada 5 segundos la conducta predominante, perteneciente a 3 categorías: 1) *natación*: cuando el animal nada en busca de una salida, un escape, nadando vigorosamente con sus cuatro miembros, las dos patas anteriores rompiendo la superficie del agua o golpeando el tanque o bien cuando el animal se introduce totalmente dentro del agua en actitud de buceo; 2) *inmovilidad*: cuando la rata no hace ningún esfuerzo por buscar una salida, sólo intenta mantenerse a flote con la cabeza fuera del agua, y 3) *trepar o escalamiento*: cuando el animal trata de subir por la pared del tubo (Figura 2).

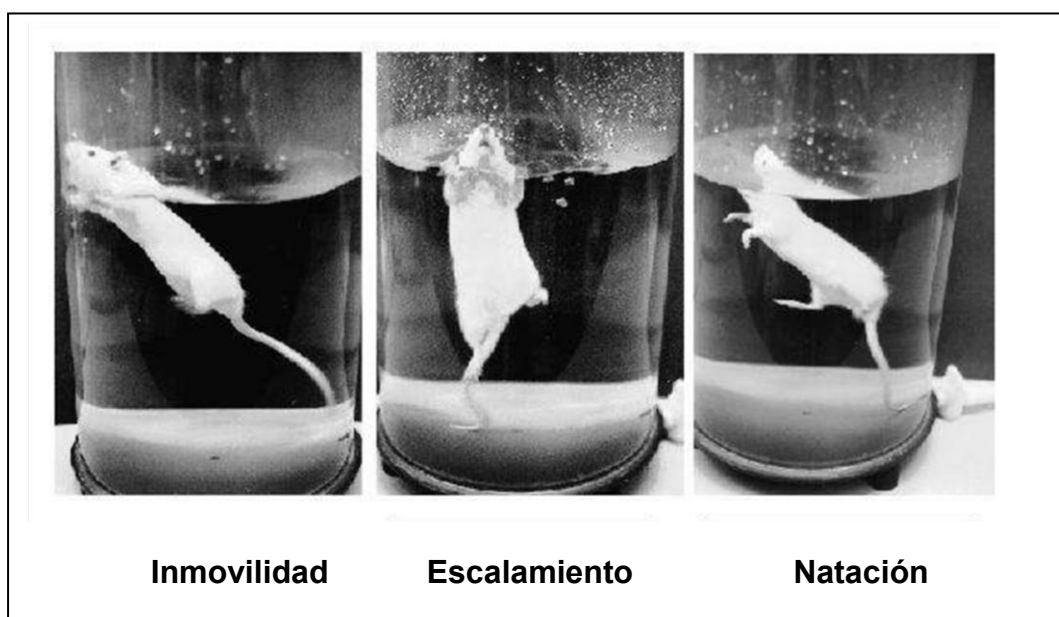


Figura 2. Conductas predominantes durante el Test de Natación Forzada: Inmovilidad, escalamiento, natación.

Los resultados se expresan como el número total de veces que se observa cada comportamiento.

La PNF permite evaluar el efecto antidepresivo de un tratamiento, y en esta prueba la disminución del tiempo de inmovilidad es indicador del efecto antidepresivo.

7.8.4. Prueba de campo abierto (PCA) (Open Field Test)

Para descartar que el efecto de los diferentes tratamientos evaluados con la PNF pudiera deberse a efectos inespecíficos relacionados con modificaciones sobre la actividad locomotora, se utilizó la prueba de campo abierto (PCA). Esta prueba se utiliza comúnmente para medir la actividad locomotora espontánea de los roedores²⁰.

El dispositivo usado para hacer este ensayo es una caja (60cm x 60cm x 40 cm). Posee un piso negro dividido en cuadrados (15 cm x 15 cm) con líneas blancas, limitados por cuatro paredes negras. El sistema está iluminado por una lámpara de 75w ubicada a una altura de 75 cm del piso, en un lugar en oscuridad y en silencio para no perturbar al animal (Figura 3).

El animal se coloca en el centro del dispositivo, se registra el número de cuadrados que la rata atravesó con sus cuatro patas durante un período de 5 min y se expresa como el número de cuadrados totales. Este número es una medida de la actividad locomotora espontánea del animal. Después de evaluar la conducta de cada animal, se procede a la limpieza del dispositivo para hacer constante la influencia olfatoria entre animales.

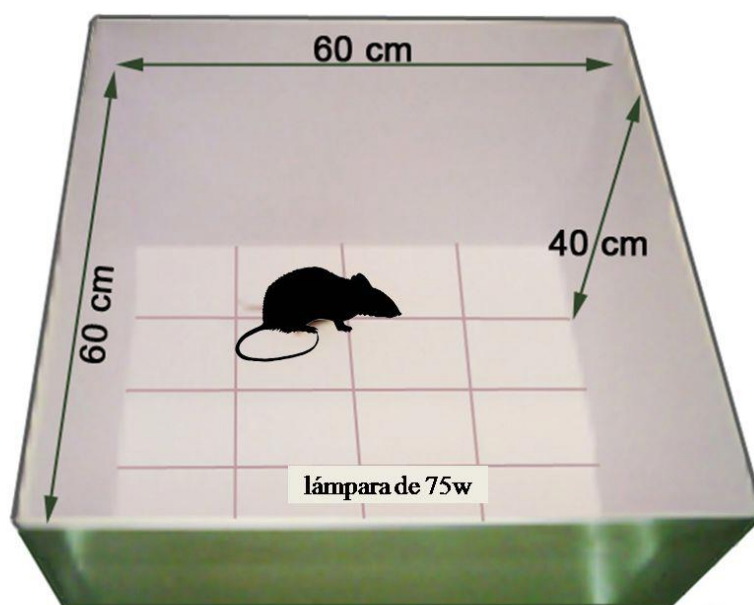


Figura 3. Prueba de campo abierto (PCA).

7.8.5. Diseño experimental y tratamiento farmacológico

Para el diseño y tratamiento se considera cada uno de los compuestos utilizados. En general se testea tanto la sal del metal que se utiliza para la preparación de los compuestos, el ligando orgánico seleccionado así como el compuesto derivado del mismo.

²⁰ W.B Essman. *J Comp Physiol Psychol.* **1967.** 66, 244-246.

7.8.5.1. Complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$

En este caso particular, el compuesto antidepresivo utilizado fue sertralina y se procedió como en trabajos anteriores²¹.

La sal de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es administrada en dosis de 2,70 y 5,40 mg/Kg de peso de animal. Para el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ se seleccionaron dosis experimentales 13,30 y 26,6 mg/Kg. Las dosis de las sales de cobre son equivalentemente a la cantidad de cobre presente en el complejo de sertralina. Las dosis altas son elegidas para evaluar la actividad dosis-respuesta.

Para el tratamiento con $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$: Para poder cotejar los resultados experimentales con los datos ya reportados en bibliografía se utilizó una dosis de 10 mg/Kg y con fines comparativos también se usó una dosis de 20 mg/Kg.

Como se mencionara, el tipo de tratamiento farmacológico administrado es crónico, y durante 14 días se les administra diariamente por vía oral a los animales una dosis constante tanto de sertralina, solución de sal de $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y el complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$.

El protocolo experimental fue el siguiente:

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 7 grupos experimentales:

- Grupo 1: Solución salina (grupo control).
- Grupo 2: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,70 mg/Kg).
- Grupo 3: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5,40 mg/Kg).
- Grupo 4: $(\text{SerH}_2)_2\text{Cl}$ (10,0 mg/Kg).
- Grupo 5: $(\text{SerH}_2)_2\text{Cl}$ (20,0 mg/Kg).
- Grupo 6: $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (13,30 mg/Kg).
- Grupo 7: $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (26,6 mg/Kg).

El experimento comienza el primer día con un ensayo de PNF (pretest) y transcurrido 24 horas del estímulo estresor, comienzan los distintos tratamientos durante 14 días seguidos.

En el día número 15 se realizan el test de comportamiento, efectuándose primero la PCA y posteriormente la PNF. Estos últimos se realizan de forma individual por cada animal en cuartos separados, con el fin de evitar estrés al resto de los animales (Figura 4).

²¹ G.E Escudero, C.H Laino, N. Martini, G.A Echeverría, O.E Piro, P.A.M Williams, E.G Ferrer. **2015**. (Patent Application No. 20150103320-Argentina).

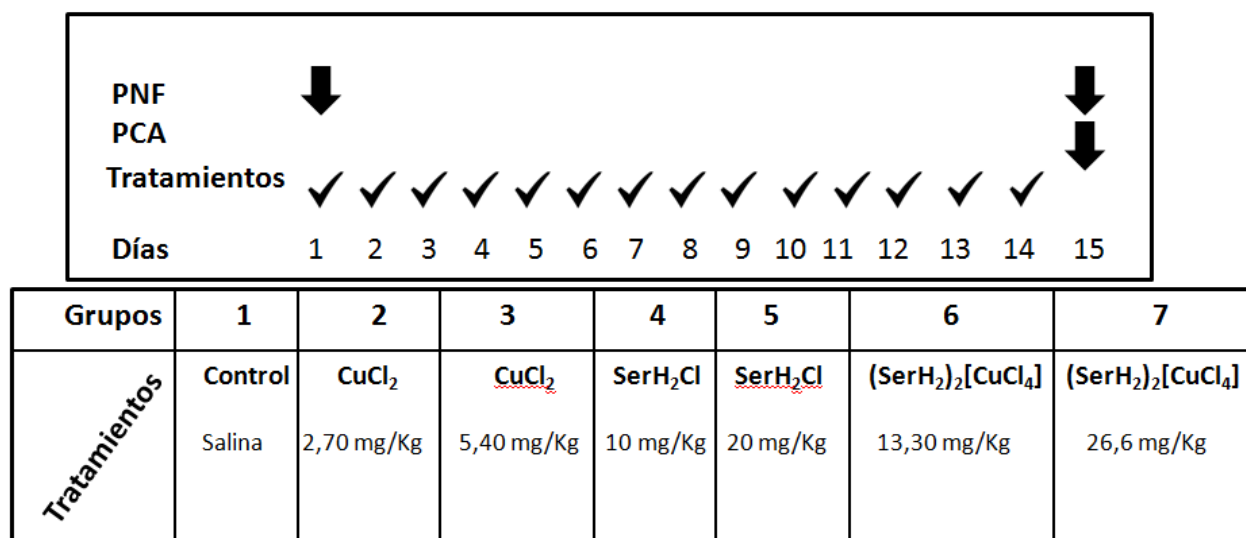


Figura 4. Diseño Experimental: protocolo de los tratamientos con droga, y los días de realización de las pruebas. PNF: prueba de natación forzada; PCA: prueba de campo abierto.

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso de ANOVA seguido del test de Bonferroni.

7.8.5.2. Complejo de magnesio

El tratamiento farmacológico efectuado con los animales con el complejo con magnesio se realizó repitiendo el mismo esquema experimental que se detalló con el complejo (SerH₂)₂[CuCl₄] (Figura 3).

El agente antidepresivo utilizado en esta ocasión es la sal de Magnesio, MgCl₂. La sal de MgCl₂.2H₂O es administrada en dosis de 20,0 y 30,0 mg/Kg de peso de animal. Para el complejo Mg(DL-pGlu)₂ las dosis experimentales administradas 20,0 y 30,0 mg/Kg son equivalentes a la cantidad de magnesio que se encuentra presente en la sal. Las dosis altas son elegidas para evaluar la actividad dosis-respuesta

El protocolo experimental fue el siguiente:

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 7 grupos experimentales:

- Grupo 1: Solución salina (grupo control).
- Grupo 2: MgCl₂.2H₂O (20,0 mg/Kg).
- Grupo 3: MgCl₂.2H₂O (30,0 mg/Kg).
- Grupo 4: Ac (DL-pGlu) (20,0 mg/Kg).
- Grupo 5: Ac (DL-pGlu) (30,0 mg/Kg).
- Grupo 6: Mg(DL-pGlu)₂ (20,00 mg/Kg).
- Grupo 7: Mg(DL-pGlu)₂ (30,0 mg/Kg).

7.9. Actividad analgésica:

7.9.1. Test de la Placa caliente

Esta prueba consiste en calentar de forma eléctrica la superficie de una platina a $54 \pm 0,8$ °C (Socrel DS- 35, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy).

Durante los ensayos las ratas son introducidas dentro de una caja circular plástica transparente que está apoyada sobre la platina (Figura 5). Las medidas son tomadas como el tiempo (segundos), que demora el animal en responder al estímulo térmico (lamerse las patas o saltar sobre la platina), ésta es la fase de latencia.

Si el animal no responde dentro de los 45 segundos, éstos son removidos de la platina para evitar daño tisular²².

La actividad analgésica fue medida una vez finalizados los distintos tratamientos y los test conductuales. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett.



Figura 5. Test de la platina caliente.

Protocolo del experimento:

Los animales fueron distribuidos en 4 grupos:

Grupo 1: Solución salina (0.4% NaCl) (control).

Grupo 2: Sertralina (SerH_2Cl) (10 mg/Kg).

Grupo 3: $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,7 mg/Kg).

Grupo 4: $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ (13,30 mg/Kg).

La solución salina y los compuestos se administraron oralmente por alimentación forzada (p.o.) durante 14 días.

²² F.E D'Amour, D.L.J Smith. *Pharmacol Exp Ther.* **1941**. 72, 74-79.

Para el tratamiento agudo, las dosis fueron administradas 60 minutos antes de la realización del test de la placa caliente o prueba de campo abierto y para los experimentos crónicos 24 h después de la última dosis administración.

7.9.2. Complejo de magnesio

Para evaluar el efecto analgésico del complejo $\text{Mg}(\text{DL-pGlu})_2$ se procedió de igual manera descrita en la sección 7.9.1, las dosis utilizadas son las mismas con las que se ensayó el efecto antidepresivo.

7.10. Medidas de interacción con albúmina sérica bovina (ABS)

La seroalbúmina bovina (ABS) se disolvió en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 7,4) a una concentración final de 6 μM . La solución de los complejos en estudio son agregados lentamente y gota a gota sobre la solución de ABS para asegurar la formación de una solución homogénea con concentraciones en el rango de 2 a 100 μM , y luego se mide la intensidad de la fluorescencia (excitación a 280 nm y emisión a 248 nm).

Los compuestos de estudio no interfirieron con la fluorescencia medidas a 25°C y a 37°C. Se realizaron triplicados independientes para cada muestra y concentración. Las medidas se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-50B (Beaconsfield, England) equipado con una lámpara pulsada de xenón (ancho medio de pico <10 ns, 60 Hz) un tubo fotomultiplicador R928 y un software FLWinlab. Las rendijas de excitación y de emisión se fijaron en 10 nm a lo largo de todo este estudio.

Los resultados experimentales obtenidos se analizan aplicando un tratamiento matemático²³ con el fin de hallar la constante de Stern-Volmer (K_{sv}) y la constante de afinidad (K_a) así como los sitios de unión, n , en la seroalbumina.

La desactivación de la fluorescencia ("*quenching*") puede ocurrir por diferentes mecanismos, y se clasifican en *quenching* dinámico y *quenching* estático. Se pueden distinguir entre sí por su diferente dependencia con la temperatura y la viscosidad. El *quenching* dinámico depende de la difusión. Dado que a altas temperaturas los coeficientes de difusión son elevados, se espera que la constante de velocidad de *quenching* aumente con el incremento de la temperatura para el *quenching* dinámico, mientras que para el estático la constante debería disminuir con el incremento de la temperatura²⁴).

El mecanismo de desactivación de la fluorescencia puede ser analizada usando la ecuación de Stern-Volmer²⁵ (1) y Stern-Volmer modificada (2):

$$F^0/F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (1)$$

Curva de Stern-Volmer

²³ L.J Farrugia. *J Appl Cryst.* **1997.** 30, 565-568.

²⁴ Z. Yang, R. Tang, Z.J Zhang. *Mol Struct.* **2012.** 1030, 19-25

²⁵ J. R Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* **1999.** 2, 24985-24990.

Donde F^0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y en presencia del desactivador, respectivamente. K_{sv} es la constante de Stern-Volmer la cual está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al desactivador (“quencher”, mayor accesibilidad, mayor K_{sv}), y $[Q]$ es la concentración del desactivador.

Asumiendo que los cambios en la fluorescencia provienen de la interacción entre desactivador y la albúmina, la constante obtenida se puede considerar como la constante de formación de complejo compuesto-albúmina.

En un cierto intervalo de concentración, la curva de F^0/F frente a $[Q]$ es lineal si el tipo de quenching involucra un único proceso: estático o dinámico, del mismo modo, la curva de $F^0/(F^0-F)$ frente a $1/[Q]$ es lineal pero sólo para *quenching* estático (debido a la formación de un complejo entre el fluoróforo y el quencher). Si el tipo de *quenching* es combinado (estático y dinámico), la curva de Stern-Volmer F^0/F frente a $[Q]$ muestra una desviación positiva (cóncava hacia el eje “y”)²⁶.

Aún si el gráfico de Stern-Volmer es lineal, hay que distinguir si se trata de un *quenching* colisional o a un *quenching* estático. Hay varias maneras de diferenciar entre uno y otro.

Generalmente las K_{sv} obtenidas de *quenching* estático son mayores que las del *quenching* colisional. Entonces, comparando la K_{sv} obtenida con un valor estimado de K_{sv} usando una K_q (constante cinética de reacción) controlada por difusión se puede tener una idea primaria del tipo de *quenching*.

Teniendo en cuenta la relación existente entre la constante de velocidad de *quenching* de una biomolécula, K_q y la constante de *quenching* dinámico K_{sv} :

$$K_q = K_{sv}/\tau_0$$

Donde τ_0 es el tiempo de vida media de la biomolécula sin desactivador y, considerando que el tiempo de vida media de fluorescencia de los biomoléculas es en promedio $\tau_0 = 10^{-8}$ s^{27,28}, puede estimarse un valor de K_q con la ecuación formulada. De acuerdo a la bibliografía, el valor máximo de K_q de referencia es de $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, entonces, si el valor de la constante estimada es mayor a ese valor puede proponerse que el mecanismo de interacción es por formación de un complejo, en caso contrario sería un *quenching* colisional. Cuando el *quenching* es estático, se supone que existen sitios de unión para el desactivador que son similares pero independientes. Esos sitios de unión así como su constante de asociación pueden ser estimados utilizando la relación matemática:

$$\log(F^0-F/F) = \log K_a + n \log [Q]$$

Donde K_a es la constante de unión o la constante de asociación aparente para la interacción droga-proteína, y n es el número de sitios de unión.

²⁶ H. Zhang, Y. Wang, Z. Fei, L. Wu, Q. Zhou. *Dyes Pigments*. **2008**. 78, 239-247.

²⁷ B. Shuyun, S. Daqian, T. Yuan, Z. Xin, L. Zhongying, Z. Hanqi. *Spectrochim Acta*. **2005**. 61, 629-636.

²⁸ M.Y Tian, X.F. Zhang, L. Xie, J.F Xiang, Y.L Tang, C. Q. J. Zhao. *Mol Struct*. **2008**. 892, 20-24.

Parámetros termodinámicos (modo de interacción).

Las fuerzas de interacción entre fármacos y biomoléculas pueden incluir interacciones electrostáticas, múltiples enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, contactos hidrófobos y estéricos dentro del sitio de unión a anticuerpos, etc. (Ross y Subramanian, 1981). Para inferir el tipo de proceso de interacción entre los ligandos o complejos y la ASB se estudian los parámetros termodinámicos, incluyendo cambio de entalpía (ΔH), cambio de entropía (ΔS) y cambio de energía libre (ΔG).

Para obtener información sobre el tipo de interacción, los parámetros termodinámicos pueden calcularse usando la ecuación de Van't Hoff²⁹:

$$\ln (K_{a2}/K_{a1}) = -\Delta H^0/R (1/T_2-1/T_1) \quad (1)$$

donde T_1 y T_2 son las temperaturas a las que se determinan K_{a1} y K_{a2} . El cambio de energía libre estándar (ΔG^0) y el cambio de entropía estándar (ΔS^0) se calculan con las conocidas relaciones termodinámicas:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_a \quad (2)$$

$$\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T \quad (3)$$

Tabla 1. Contribuciones de las fuerzas de interacción ABS-compuesto al ΔH y ΔS .

Proceso	ΔH	ΔS
Asociación hidrofóbica	Positivo	Positivo
Interacciones de van der Waals	Negativo	Negativo
Formación de puente de hidrógeno en un medio de constante dieléctrica baja	Negativo	Negativo
Interacción iónica (neutralización de carga)	Ligeramente Positivo o Negativo	Positivo
Protonación	Negativo	Positivo

*Tabla 1 extraída del reporte de Ross y Subramanian³²

Si el ΔG^0 toma valores negativos el proceso de interacción es espontáneo. El cambio de entalpía negativo sugiere que la unión entre los compuestos en estudio y la ASB es exotérmica y entonces el valor de la constante de asociación disminuye con el aumento de la temperatura. La combinación de valores ΔH^0 y ΔS^0 obtenidos en cada sistema indica el tipo de fuerzas de interacción involucradas (Tabla 1).³⁰

²⁹ Y-J. Hu, Y. Liu, Z-B. Pia, S-S. Qu. *Bioorg Med Chem.* **2005**.13, 6609-6614.

³⁰ P.D Ross, S. Subramanian. *Biochemistry.* **1981**. 20, 3096-3102.

Conclusiones Generales

En esta tesis doctoral se prepararon complejos de coordinación derivados de Cu(II) y utilizando como ligandos hidrocloreto de sertralina y metimazol y de Mg(II) con ácido DL-piroglutámico y N,N dimetilacetamida.

Para los compuestos con sertralina se obtuvieron dos formas cristalinas, la forma hidratada y anhidra compuestas por un anión complejo de coordinación que contiene Cu(II) y el catión sertralonio $((\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$). Los dos compuestos se han caracterizado por varias técnicas fisicoquímicas y sus estructuras cristalinas se pudieron determinar mediante difracción de rayos X.

En sus formas cristalinas, las moléculas de sertralina aparecen en su forma catiónica (SerH_2^+), protonadas en sus grupos aminos y muestran una flexibilidad conformacional significativa. Las sales cristalinas se estabilizan adicionalmente mediante enlaces intermoleculares $\text{NH}_2^+ \dots [\text{CuCl}_4]^{2-}$ y la molécula de agua presentando enlaces del tipo $\text{NH}_2^+ \dots \text{O}$ y puentes de hidrógeno no convencionales: $\text{O}-\text{H} \dots \text{Cl}$. Las técnicas de caracterización utilizadas, FTIR, Raman, reflectancia difusa y las espectroscopias de UV-vis y EPR mostraron características típicas de los compuestos de tetraclorocuprato(II).

En cuanto a las actividades biológicas estudiadas, para la actividad antimicrobiana se encontró un comportamiento similar al fármaco sertralina.

Por otra parte, el ligando clorhidrato de sertralina fue capaz de inhibir la enzima lactoperoxidasa (LPO) mostrando entonces actividad antitiroidea, mientras que el complejo de cobre no ejerce ningún efecto inhibitor ni mostró tampoco capacidad para formar complejos de transferencia de carga con el yodo.

El estudio catalítico realizado muestra que el complejo exhibe actividad de bromación catalítica indicando que puede considerarse como un posible modelo funcional de la enzima bromoperoxidasa (constante de pseudo primer orden y tiempo de vida media de $0,157 \text{ min}^{-1}$ y $4,41 \text{ min}$, respectivamente).

Su actividad catalítica también se demostró mediante su capacidad de simulación de la enzima superóxido dismutasa (SOD) con un valor de $\text{IC}_{50} = 6,3 \times 10^{-6} \text{ M}$.

La evaluación *in vivo* de la actividad antidepresiva mostró efectos contra la depresión los cuales fueron dependientes de la dosis del complejo $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$, siendo muy prometedora la supresión del efecto secundario anorexigénico causado por el fármaco clorhidrato de sertralina.

Los tratamientos agudos y crónicos en la prueba analgésica mostraron un incremento del 30,36 % en sertralina y un valor de 95,82 % para $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ en la latencia de lamer a dosis comparativas de 10 mg(sertralina)/kg, lo que indica una acción analgésica considerable.

La evaluación de la capacidad de unión de BSA está de acuerdo con la formación de un complejo entre la albúmina y $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ donde las interacciones que permiten la unión serían preferentemente del tipo de van der Waals.

En términos generales, se pudo mostrar que la combinación del fármaco sertralina con cobre produjo un efecto sinérgico sobre la actividad antidepresiva, generando un efecto anti anorexigénico, pero también sobre el efecto analgésico, las actividades catalíticas contra el anión superóxido y como compuesto mimético de las bromoperoxidasas.

Respecto de los complejos derivados de cobre con metimazol, los intentos de preparar complejos de Cu(II) ternarios que contengan los ligandos de metimazol e imidazol dieron lugar a la oxidación del ligando metimazol y la subsecuente formación de dos complejos de cobre. Uno de ellos presenta un ligando con puente disulfuro ($[\text{Cu}(\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}(1)$) y el otro con un sulfuro como puente entre dos grupos metilimidazol ($[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4\text{H}_2\text{O}](2)$). Además, un tercer complejo se pudo obtener utilizando la técnica de descomposición térmica (termo-análisis) partiendo de (2) dando lugar a la formulación $[\text{Cu}(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{S})\text{SO}_4](3)$ al perder la molécula de agua. Los compuestos fueron caracterizados en estado sólido y en solución utilizando las técnicas fisicoquímicas ya mencionadas.

Los estudios biológicos se realizaron para los complejos (1) y (2) ya que la especie en solución que formaba el complejo (3) era similar al de (2). Ambos complejos demostraron la capacidad de inhibir la fosfatasa ácida (FAC) pero el comportamiento del complejo (1) fue más eficiente con un valor de IC_{50} de 0,58 μM que puede atribuirse a su disposición estructural.

En contraste con este resultado, el complejo (2) mostró una habilidad superior para dismutar el radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ con un $\text{IC}_{50} = 1,2 \times 10^{-6} \text{ M}$ ($k_{\text{MCCF}} = 1,49 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) y su estructura distorsionada alrededor del centro de Cu(II) probablemente sea la razón causante de esta diferencia.

En contraste, el complejo (1) presenta una fuerte capacidad de actuar sobre el radical DPPH $^{\cdot}$ con una inhibición del $\sim 100\%$ a una concentración de 82,25 μM .

Ambos complejos (1) y (2) mostraron ser capaces de simular la actividad de las peroxidasas. El complejo (2) ($k_{\text{cat}}/K_m = 5,48 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 6,45 \text{ min}^{-1}$) se comportó como un mejor catalizador de rojo fenol que el complejo (1) ($k_{\text{cat}}/K_m = 104,5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 0,14 \text{ min}^{-1}$). En oposición, el complejo (1) reveló mayor

selectividad en la oxidación de pirogalol ($k_{\text{cat}}/K_m = 308153,02 \text{ M}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 45,66 \text{ min}^{-1}$).

Ambos complejos fueron capaces de ser transportados por la albúmina. Sus valores de K_b fueron alrededor de $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}$, valores que sugieren que la unión es a través de un sitio menor afinidad en la proteína. De acuerdo a los parámetros termodinámicos, la fuerza impulsora del proceso fue principalmente entálpica y la unión se produce a través de las interacciones de van der Waals y la formación de enlaces de hidrógeno. Los estudios de EPR estuvieron en concordancia con una interacción a través de los residuos de N de la albúmina.

A pesar que se requieren estudios adicionales, estos resultados sugieren que los compuestos ensayados pueden ser considerados como buenos candidatos como simuladores de enzimas SOD y peroxidasas e inhibidores eficientes de FAc.

Otro de los biometales seleccionados para este estudio fue el magnesio por su beneficio como bioelemento. Como se mencionara, el magnesio ha despertado un gran interés en dilucidar su participación en la depresión y el dolor.

La síntesis solvotérmica nos permitió obtener un nuevo compuesto pero en su forma cristalina, como complejo de coordinación a diferencia de la sal del pidolato existente con magnesio. Evidentemente, la presencia de la especie racémica del ácido DL-piroglutámico favorece la cristalización en un medio no acuoso. Los cristales son estables a temperatura ambiente y solubles en agua especialmente aptos para su estudio *in vivo*.

Las evidencias asociadas a la relación entre la deficiencia de magnesio y el desarrollo de un estado depresivo nos animaron a analizar el nuevo complejo como un posible antidepresivo. Como consecuencia, obtuvimos resultados prometedores con respecto a la reducción del tiempo de inmovilidad y el incremento de la capacidad de natación con una dosis de 30 mg(Mg)/Kg del nuevo complejo.

Además, la actividad analgésica medida demuestra que el nuevo compuesto es capaz de aumentar la respuesta de latencia en 70,0% denotando fuerte actividad.

Teniendo en cuenta los grupos químicos presentes en el ligando, se analizó la actividad antitiroidea para revelar la capacidad del complejo de capturar el yodo, que es uno de los posibles mecanismos de acción de los fármacos antitiroideos. En ese sentido se pudo demostrar la formación de un complejo de transferencia de carga con valor de $K_c = 45366,5 \text{ M}^{-1}$ y un coeficiente de extinción molar de $\varepsilon = 2079,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ donde además el cálculo del parámetro de energía libre $\Delta G^0 = -26,55 \text{ KJ/mol}$ indica la espontaneidad del mismo.

Por espectroscopia de fluorescencia 3D, también se determinó la interacción con la proteína transportadora albúmina y las modificaciones de los picos característicos A y B señalan procesos diferentes de interacción para el ligando y el complejo lo cual es razonable considerando que el ligando se encuentra en forma aniónica, con el grupo carboxilato desprotonado a pH fisiológico a diferencia del complejo.

El otro complejo de magnesio preparado se formó a partir de un procedimiento sintético para obtener un complejo de coordinación que contenga magnesio usando el solvente farmacéutico N,N dimetilacetamida (DMA), formulado en estado sólido como $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Este nuevo compuesto se caracterizó por varias técnicas fisicoquímicas. La estructura cristalina se resolvió mediante métodos de difracción de rayos X y se examinó con análisis de superficie de Hirshfeld (HS). La optimización de las geometrías nos permitió realizar un análisis completo mediante la espectroscopía de FTIR, Raman y UV-Vis que reafirma la caracterización tanto del cristal obtenido como la de su especie bioactiva en solución para su uso en la determinación de actividades farmacológicas *in vitro*.

Este estudio demuestra una estimulación directa de la actividad de ALP por el complejo de magnesio ($K_m = 0,36 \text{ mM}$) que es mayor que la que se logra utilizando sólo MgCl_2 lográndose además una remarcada mayor eficiencia catalítica ($k_{\text{cat}}/K_m = 770,6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Dados los grupos químicos presentes en el ligando, se examinó la actividad antitiroidea para revelar la capacidad del ligando DMA y el complejo de magnesio de capturar yodo, ya que es uno de los posibles mecanismos de acción de los fármacos antitiroideos. Para DMA se logró calcular una constante de la interacción para la transferencia de carga $K_C = 12479 \text{ M}^{-1}$ cuyo valor es indicativo de actividad antitiroidea. El complejo con Mg, en cambio, interacciona de manera diferente provocando igualmente la desaparición de yodo y sugiriendo otro posible mecanismo de acción que también sería indicativo de esta actividad.

La interacción con la albúmina sérica bovina se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia. Los ensayos de interacción respaldan la idea de que el complejo como $[\text{Mg}(\text{DMA})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, posiblemente podría transportarse de manera similar al Mg^{2+} a través de la interacción con la cadena polipeptídica de la proteína.

Publicaciones derivadas de esta tesis

“Evidence of promising biological-pharmacological activities of the sertraline-based copper complex: (SerH₂)₂[CuCl₄]”. N. Martini, J. Parente, M.E. Toledo, G.E. Escudero, C.H. Laino, J.J. Martínez, G.A. Echeverría, L. Lezáma, O.E. Piro, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. Journal of Inorganic Biochemistry (ISSN: 0162-0134). **2017**. 174, 76-89.

“Potential bio-protective effect of copper compounds: mimicking SOD and peroxidases enzymes and inhibiting acid phosphatase as a target for anti-osteoporotic chemotherapeutics”. N. Martini, J.E. Parente, F. D’Alessandro, M. Rey, Al. Rizzi, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. Molecular Biology Reports. (ISSN: 0301-4851). **2019**. 46, 867-885.

“Antidepressant and antinociceptive activities in animal models and in vitro assessment of the anti-thyroid activity of bis(DL-pyroglutamate)magnesium complex”. N. Martini, J.E. Parente, M.E. Toledo, G.E. Escudero, C. Laino, O.E. Piro, G. Echeverría, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. Pharmacological Reports (1734-1140). **2019**. 71, 1273-1280.

“Tetraaquo-bis-(n,n-dimethylacetamide-o)magnesium(ii) chloride dihydrate. An option to improve magnesium effect on phosphatase stimulation and albumin binding”. N. Martini; J.E. Parente; G. Restrepo-guerrero; C.A. Franca; O.E. Piro; G.A. Echeverría; P.A.M. Williams; E. Ferrer. Journal of Molecular Structure. **2020**. Vol. 1223.

Publicaciones relacionadas

“Biological activities of Zn(II)-S-methyl-cysteine complex as antiradical, inhibitor of acid phosphatase enzyme and in vivo antidepressant effects”. G.E. Escudero, N. Martini, K. Jori, N. Jori, N. R. Maresca, C. H. Laino, L. G. Naso, P. A.M. Williams & E. G. Ferrer. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. (DOI: 10.3109/14756366.2016.1160900). **2016**. 31:6, 1625-1631,

“Improving the antidepressant action of sertraline by co-crystallization with the antioxidant agent coumarin 3-carboxylic acid. Structural determinations”. G.E. Escudero, C.H. Laino, G.A. Echeverría, O.E. Piro, N. Martini, A.N. Rodríguez, J.J. Martínez Medina, L.L. López Tévez, E.G. Ferrer, P.A.M. Williams. Chemico-Biological Interactions. (ISSN: 0009-2797). **2016**. 249, 46-55.

“Zn(II) Based Potential Drug Containing Sertraline as a Strong Antidepressant Agent”. G.E. Escudero, C.H. Laino, N. Martini, G.A. Echeverría, O.E. Piro, P.A.M. Williams, E.G. Ferrer. Annals of Medicinal Chemistry and Research. (ISSN:2378-9336). **2017**. Vol 3. 1017.

Congresos Internacionales

5º SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA DE COORDINACIÓN Y ORGANOMETÁLICA, 5th LATIN AMERICAN SYMPOSIUM ON COORDINATION AND ORGANOMETALLIC CHEMISTRY. “Novel antidepressant activity in animal model of Zn(II)-S-methyl-cysteine complex and other pharmacological activities”. E.G. Ferrer, G.E. Escudero, N. Martini, K. Jori, N. Jori, N.R. Maresca, C.H. Laino, P.A.M. Williams. Angra dos Reis, RJ Brasil. 18-23 de octubre 2015.

EUROBIC 13 (13TH EUROPEAN BIOLOGICAL INORGANIC) CHEMISTRY CONFERENCE. “Antidepressant activity of sertraline derived compounds”. N. Martini; G.E. Escudero; N.R. Maresca; C.H. Laino; P.A.M. Williams; E.G. Ferrer. Budapest, Hungary. 28-8 al 01-9 de 2016. (ISBN 978-963-9970-67-0).

EUROBIC 14 (14TH EUROPEAN BIOLOGICAL INORGANIC) CHEMISTRY CONFERENCE.

“Potential bio-protective effect copper compounds: mimicking SOD and peroxidases enzymes and inhibiting acid phosphatase as a target for anti-osteoporotic chemotherapeutics”. N. Martini; J.E. Parente; F. D’Alessandro; M.Rey; A. Rizzi; P.A.M. Williams; E. Ferrer. Birmingham, United Kingdom . 26-30 agosto de 2018.

Congresos Nacionales

XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica

“ACTIVIDAD ANTIDEPRESIVA Y EFECTOS INHIBITORIOS SOBRE FOSFATASA ÁCIDA DEL COMPLEJO ZN(S-METIL-CISTEÍNA”.

Escudero Graciela, Jori Khalil, Jori Nadir, Martini Nancy, Laino Carlos H., Williams Patricia A.M., Ferrer Evelina G. Carácter de la participación: presentación del póster.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 12-15 abril 2015.

XX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica

“PROMETEDORAS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS-FARMACOLÓGICAS DEL COMPLEJO DERIVADO DE SERTRALINA CON COBRE: $(\text{SerH}_2)_2[\text{CuCl}_4]$ ”. Martini Nancy, Parente Juliana E., Toledo María E., Escudero Graciela E., Laino Carlos H., Echeverría Gustavo A., Piro Oscar E, Williams Patricia A.M., Ferrer Evelina G. Ferrer.

Villa Carlos Paz, Córdoba. Argentina. 16-19 Mayo 2017.

XXI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica

“PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE DL PIROGLUTAMATO DE MAGNESIO”.

Martini Nancy, Parente Juliana E., Toledo María E., Escudero Graciela E., Laino Carlos H., Echeverría Gustavo A., Piro Oscar E., Williams Patricia A.M., Ferrer Evelina G. Ferrer.
San miguel de Tucumán. Tucumán. Argentina. 14-17 Abril 2019.